

**LUIZA RACHEL PINHEIRO DE CARVALHO**

**Desenvolvimento de matriz 3D a base de quitosana, gelatina e condroitina como suporte para osteogênese de células-tronco derivadas do tecido adiposo e sua aplicação em Engenharia de Tecido ósseo**

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

06/2012

**LUIZA RACHEL PINHEIRO DE CARVALHO**

**Desenvolvimento de matriz 3D a base de quitosana, gelatina e condroitina como suporte para osteogênese de células-tronco derivadas do tecido adiposo e sua aplicação em Engenharia de Tecido ósseo.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Alfredo Miranda de Góes

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

06/2012

“Daquilo que eu sei  
Nem tudo me deu clareza  
Nem tudo foi permitido  
Nem tudo me deu certeza...

Daquilo que eu sei  
Nem tudo foi proibido  
Nem tudo me foi possível  
Nem tudo foi concebido...

Não fechei os olhos  
Não tapei os ouvidos  
Cheirei, toquei, provei  
Ah Eu!  
Usei todos os sentidos”

Carvalho, Luiza Rachel Pinheiro de.  
Desenvolvimento de matriz 3D a base de quitosana,  
gelatina e condroitina como suporte para osteogênese de células-tronco  
derivadas do tecido adiposo e sua aplicação em Engenharia de Tecido  
ósseo./ Luiza Rachel Pinheiro de Carvalho. - 2012.  
127f.: 33il.

Tese (Doutorado em Ciências – Ênfase em Biologia  
Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto  
de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Belo  
Horizonte, 2012.

Orientador: Alfredo Miranda de Góes.

1. Engenharia de Tecido ósseo. 2. Matriz 3D. 3. Célula-tronco.  
I. Góes, Alfredo Miranda de. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia.  
III. Título.

*Aos meus amados pais, fonte inesgotável de amor e acalento, por terem feito dos meus sonhos os seus...*

*Aos meus irmãos por terem sonhado comigo os meus sonhos, comemorado minhas vitórias e tornado meus insucessos ao longo desta vida mais amenos.*

*À Bete pelas inúmeras vezes que me enxergou melhor do que eu sou e por ter me olhado devagar, enquanto a maioria das pessoas olha rápido demais.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradecer às pessoas pelo que elas fizeram escrevendo ou dizendo: muito obrigada ainda é pouco diante da grandeza das atitudes a mim dispensadas. Ao carinho, a uma palavra amiga, às inúmeras discussões, aos aprendizados, a um olhar, a um sorriso... tantas atitudes e oferecidas sem pedir nada em troca. Agradeço a cada um que contribuiu direta e indiretamente para a realização desse trabalho. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.*

Ao professor Alfredo, minha profunda admiração a este pesquisador que de forma única levou-me a desbravar uma nova fronteira em minha jornada científica, mudando definitivamente a minha vida para melhor. Obrigada pela amizade e apoio incondicionais durante esses anos. Obrigada por nunca ter desacreditado de mim. Muito além de um cientista fantástico, é um homem extraordinário.

Aos professores Dawidson, Gerluza e Patrícia Valério pela colaboração e ensinamentos.

Às minhas grandes amigas Rafaela, Cíntia, Natália, Estefânia e Viviane por tantas vezes que com tanta sensibilidade, bondade e amizade devolveram-me a tranquilidade em dias difíceis. Obrigada pelas incontáveis horas de confidências, conselhos e sonhos compartilhados.

Aos queridos amigos do LICM Pedro, Juliana, Naira, Alexandra, Alessandra, Elis, Marina, Ana Cláudia, Ana Carolina Reis, Pablo, Thaís e Viviane Gomide, que, muito além de ensinamentos, compartilham vidas. Muito além de experimentos, compartilham sonhos e sorrisos! Obrigada pelo apoio, incentivo, conselhos, torcida, conversas e brincadeiras que deixam os dias mais leves!

Ao Pablo Herthel e Juliana Lott pelas valiosas discussões, disponibilidade em me ajudar com os experimentos e por me motivar a ir além.

À Adriana Bozzi, Laura, Juliana Barbosa, Lílian, Cristiane Corrêa, Silviene, Ana Carolina, Carol Melo, Carol Andrade, Arthur, Jeruza, Natássia, Elisa, Maira, Michele o “*et al*” indispensável e extremamente agradável para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos da Biologia Celular Violeta, Danielle, Rodolfo, Paula, Luana, Thalita e Patrícia pelos bons momentos divididos durante as disciplinas. Pelos trabalhos realizados e risadas que só deixaram as disciplinas mais agradáveis!

Agradeço ainda aos meus amigos Patrícia, Staell, Daniel e Danilo por estarem sempre me incentivando, apoiando e torcendo! Muito obrigada!

À Peu pelo cuidado com os animais e longas horas de sorrisos.

Aos professores do curso de Biologia Celular pelo conhecimento adquirido.

Ao 3B's Research Group: Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, grupo de Pesquisa do Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa em Portugal. Em especial ao Dr. Vitor M. Correlo.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, em especial a profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) - pela irradiação das matrizes tridimensionais.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) - prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia e a técnica Ivete, pelo auxílio com a microscopia eletrônica de varredura.

À CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo suporte financeiro.

*“Toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

***Albert Einstein***



## RESUMO

A reconstrução de grandes segmentos ósseos continua a ser um problema clínico importante. Os impactos clínicos e econômicos de tratamentos de defeito ósseo são surpreendentes. As abordagens terapêuticas atuais incluem transplante de enxertos ou implantes de diferentes biomateriais sintéticos, mas nenhum deles revelou-se plenamente satisfatória. A Engenharia de Tecidos fornece uma alternativa promissora para a reparação de lesões no tecido ósseo provocada por traumas ou associadas ao envelhecimento, como a osteoporose. A proposta desta nova área da medicina regenerativa consiste em combinar células, matriz suporte e agentes bioativos para a regeneração de um novo tecido funcional. As estruturas porosas 3D são usadas como modelos para a semeadura celular temporária, migração, proliferação e diferenciação antes da regeneração do tecido biologicamente funcional ou da matriz extracelular natural. No campo da ortopedia, o uso de implantes bioabsorvíveis está se tornando mais frequente. Essas matrizes devem ser porosas, se assemelhar à MEC do tecido nativo, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis. A quitosana, em associação à gelatina e condrotina, atende às necessidades básicas para a escolha do polímero constituinte da matriz. A decisão do tipo celular é particularmente importante no desenvolvimento da Engenharia de Tecidos. Células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) surgem como candidata ideal a essa técnica, uma vez que apresenta potencial de autorenovação e multilinhagem. Partindo desse princípio, o presente trabalho visou desenvolver e caracterizar matrizes 3D de quitosana, gelatina e condroitina e avaliar resposta *in vitro* e *in vivo* de osteogênese de ADSC nesses biomateriais. A matriz 3D neste estudo se apresentou altamente porosa, possuindo poros interconectados. Quando induzidas à osteogênese, tanto em cultivo 2D quanto 3D, as ADSC passaram a expressar marcadores específicos de células osteogênicas. Em cultivo em matriz 3D, ADSC foram capazes de aderência e interconectividade celular, além de terem sua proliferação, viabilidade e osteogênese aumentadas, como demonstram os resultados dos ensaios de MTT, FA, dosagem de colágeno e colorações de estruturas mineralizadas. Através de análises dos implantes em sítio ectópico e em lesões de calvária de ratos *in vivo* foi possível demonstrar que a matriz 3D não induziu uma resposta inflamatória intensa e não afetou a função dos tecidos adjacentes ao implante. A matriz se mostrou biocompatível e biodegradável, além de permitir a angiogênese do implante. Quando colonizadas por ADSC, os implantes apresentaram uma angiogênese precoce, e uma osteogênese mais madura. Além disso, ADSC-EGFP foram visualizadas inseridas na MEC neoformada. Assim, matrizes 3D desenvolvidas no presente estudo se mostraram promissoras para engenharia de tecidos ósseo, sendo biocompatíveis, biodegradáveis e provendo um bom ambiente para a adesão e proliferação, angiogênese e osteogênese celular. A união dos dados obtidos por este trabalho nos permite vislumbrar a possibilidade de utilização da matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina como um potencial carreador para células-tronco mesenquimais na Engenharia de Tecido ósseo. Assim, nosso estudo abre uma perspectiva para sua aplicação clínica e para futuros estudos destinados à reconstrução tecidual.

**Palavras-chaves:** Engenharia de Tecido, matriz 3D, quitosana, célula-tronco, osteogênese, reparo ósseo.

## ABSTRACT

The reconstruction of major bone segments remains a significant clinical problem. The clinical and economic impacts of the bone defect treatments are amazing. The currently available therapeutic approaches include transplant grafts or different synthetic biomaterials implants, but none has proved to be entirely satisfactory. Tissue Engineering provides a promising alternative for the repair of lesions in the bone tissue caused by trauma or associated with aging such as osteoporosis. The purpose of this new field of regenerative medicine is to combine cell, scaffold and bioactive agents for the regeneration of a new functional tissue. The 3D porous structures are used as models for the temporary cell seeding, migration, proliferation and differentiation of the tissue prior to regeneration or biologically functional natural extracellular matrix. In the field of orthopedics, the use of bioabsorbable implants is becoming more common. These arrays must be porous extracellular matrix (ECM), resemble the native tissue, and be biocompatible and biodegradable. Chitosan, in combination with gelatin and chondroitin, meets the basic needs for the choice of the constituent polymer matrix. The decision of the cell type is particularly important in the development of tissue engineering. Stem cells derived from adipose tissue (ADSC) appear to be an ideal candidate for this technique, since it presents the potential for self and multilineage. Based on this principle, this study aimed to develop and characterize 3D matrices of chitosan, gelatin and chondroitin, and assessing response *in vitro* and *in vivo* of ADSC osteogenesis in these scaffolds. The 3D matrix of this study was highly porous, having interconnected pores. When osteogenesis is induced, in 2D and 3D culture, the ADSC began to express specific markers of osteogenic cells. In cultivation in 3D matrix, ADSC were capable of cell adhesion and interconnectivity, as well as having their proliferation, viability and increased osteogenesis, as demonstrated by the results of MTT assay, FA, measurement of collagen and staining of mineralized structures. Through analysis of the ectopic site implants and implants in rat calvarias lesions *in vivo*, it was possible to show that the 3D matrix did not induce a strong inflammatory response and did not affect the function of the implanted tissue. The matrix was shown to be biocompatible and biodegradable, and allows the implant angiogenesis. When colonized by ADSC, the implants had an early angiogenesis and a mature osteogenesis. Furthermore, ADSC-EGFP were inserted into the newly formed ECM and visualized. Thus, 3D matrices developed in this study showed promise for bone tissue engineering and it is biocompatible, biodegradable and provides a good environment for the cell attachment and proliferation, angiogenesis and osteogenesis. The union of the data obtained for this work allows us to glimpse the possibility of using the 3D matrix of chitosan, gelatin and chondroitin as a potential carrier for mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. Thus, our study opens a perspective for clinical application and for future studies for the reconstruction of tissues.

**Keywords:** Tissue Engineering, 3D matrix, chitosan, stem cell, osteogenesis, bone repair.

## Lista de abreviações, siglas e símbolos

%	Porcentagem
µg, ng	Micrograma, nanograma
ADSC	Célula-tronco derivada do tecido adiposo
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina
BMP	Proteína morfogenética óssea
BSA	Albumina do Soro Bovino
CD	Grupo de diferenciação
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEMEL	Cento de Microscopia Eletrônica
CFU	Unidade formadora de colônia
cm, mm, µm, nm	Centímetro, milímetro, micrômetro, nanômetro
DEMET	Departamento de Metalurgia
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiamidina
EGFP	Proteína Verde Fuorescente
ESC	Células-tronco embrionária
FA	Fosfatase alcalina
FIT	Fluoresceína tiocianato
H&E	Coloração hematoxilina-eosina
HSC	Célula-tronco hematopoiética
iPS	Célula de pluripotência induzida
Kg	Quilograma
Kgy	Kilo gray
M	Molar
MC	Meio controle
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL, µl	Mililitro, microlitro
MO	Meio osteogênico
MTT	Tetrazólio3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio Bromide
NBT	Nitroblue tetrazólio clorídrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
°C	Grau Celsius

PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSA	Antibióticos gentamicina , penicilina e estreptomicina
RGD	Motivo arginino, glicina e asparagina
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
UV	Ultravioleta
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Proteínas constituintes da parte orgânica da matriz óssea.....	23
<b>Figura 2:</b> Técnica de Engenharia de Tecido.....	29
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo dos princípios da engenharia de tecidos.....	30
<b>Figura 4:</b> Esquema explicativo dos tipos de divisão de células-tronco.....	31
<b>Figura 5:</b> Potencial de autorrenovação e de diferenciação em multilinhagens das células-tronco mesenquimais.....	33
<b>Figura 6:</b> Estrutura química da quitosana.....	44
<b>Figura 7:</b> Tabela de iniciadores utilizados para amplificação dos segmentos gênicos: osteopontina, osteocalcina e $\beta$ -actina.....	58
<b>Figura 8:</b> Desenho experimental dos implantes em dorso de ratos .....	62
<b>Figura 9:</b> Implante de matrizes 3D em tecido subcutâneo de ratos.....	63
<b>Figura 10:</b> Implante de matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina na calota craniana.....	64
<b>Figura 11:</b> Aspectos macroscópicos da matriz 3D porosa de quitosana, gelatina e condroitina embebidas em álcool etílico 100%.....	66
<b>Figura 12:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura de matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina.....	67
<b>Figura 13:</b> Cultura de células-tronco derivadas de tecido adiposo em meio controle.....	69
<b>Figura 14:</b> Análise fenotípica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo por citometria de fluxo.....	70
<b>Figura 15:</b> Análise fenotípica de ADSC – EGFP por imunofluorescência.....	70
<b>Figura 16:</b> Cortes morfológicos de matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina após três dias de colonização por células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.....	71
<b>Figura 17:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura de matriz 3D colonizadas por células-tronco mesenquimais de tecido adiposo por 3 horas.....	72
<b>Figura 18:</b> Cultura de células-tronco derivadas do tecido adiposo em meio osteogênico.....	73
<b>Figura 19:</b> Visualização de nódulos ósseos.....	73
<b>Figura 20:</b> Formação dos cristais de formazan em cultura 2D de ADSC.....	76
<b>Figura 21:</b> Produção de Fosfatase Alcalina em culturas 2D de ADSC.....	78
<b>Figura 22:</b> Marcação de colágeno celular em culturas 2D de ADSC.....	80
<b>Figura 23:</b> Visualização de estruturas mineralizadas por marcação por Tetraciclina.....	81

<b>Figura 24:</b> Visualização de estruturas mineralizadas por coloração do tipo Von Kossa.....	81
<b>Figura 25.</b> Análise fenotípica de ADSC por citometria de fluxo após 30 dias de indução osteogênica.....	83
<b>Figura 26.</b> Análise fenotípica de ADSC por imunofluorescência após 30 dias de indução osteogênica.....	84
<b>Figura 27:</b> Detecção de osteopontina e osteopontina em culturas 2D e 3D submetidas a 21 dias de estímulo osteogênico.....	85
<b>Figura 28:</b> Análise histológica dos implantes subcutâneos.....	88
<b>Figura 29:</b> Análise histológica dos implantes subcutâneos.....	90
<b>Figura 30:</b> Resultado histológico dos animais apenas lesados após 12 semanas....	91
<b>Figura 31:</b> Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D não colonizada após 4 semanas de pós-operatório.....	93
<b>Figura 32:</b> Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D não colonizada após 8 semanas de pós-operatório.....	93
<b>Figura 33:</b> Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D não colonizada após 12 semanas de pós-operatório.....	94
<b>Figura 34:</b> Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D colonizada por ADSC após 4 semanas de pós-operatório.....	94
<b>Figura 35:</b> Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D colonizada por ADSC após 8 semanas de pós-operatório.....	95
<b>Figura 36:</b> Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D colonizada por ADSC após 12 semanas de pós-operatório.....	95
<b>Figura 37:</b> Análise imunohistoquímica após 4 semanas de implante.....	96

## Lista de Gráficos e Tabelas

<b>Gráfico 1:</b> Teste de degradação da matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina..	67
<b>Gráfico 2:</b> Metabolização do MTT por ADSC em cultivo 2D.....	75
<b>Gráfico 3:</b> Metabolização do MTT por ADSC em cultivo 3D.....	75
<b>Gráfico 4:</b> Produção de Fosfatase Alcalina por ADSC em cultivo 2D.....	77
<b>Gráfico 5:</b> Produção de Fosfatase Alcalina por ADSC em cultivo 3D.....	77
<b>Gráfico 6:</b> Produção de colágeno por ADSC em cultivo 2D.....	79
<b>Gráfico 7:</b> Produção de colágeno por ADSC em cultivo 3D.....	79
<b>Gráfico 8:</b> Quantificação de estruturas mineralizadas em cultura 2D.....	82
<b>Gráfico 9:</b> Quantificação de estruturas mineralizadas em cultura 3D.....	82
<b>Gráfico 10:</b> Quantificação de neovascularização após implantes subcutâneos.....	90
<b>Tabela 1:</b> Propriedades mecânicas da matriz 3D de quitosa, gelatina e condroitina	68

# SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	19
<b>2 Revisão de literatura</b> .....	21
2.1 Tecido ósseo.....	21
2.1.2 Injúrias acometidas ao tecido ósseo.....	24
2.1.3 Reparo tecidual ósseo.....	25
2.2 Engenharia de Tecidos.....	28
<b>3 Justificativa</b> .....	47
<b>4 Objetivos</b> .....	49
<b>5 Metodologia</b> .....	50
5.1 Preparação dos meios de cultura celular.....	50
5.1.1 Meio controle.....	50
5.1.2 Meio de indução osteogênica.....	50
5.2 Animais.....	51
5.3 Preparações das matrizes tridimensional (biomaterial).....	51
5.4 Extração das células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC).....	51
5.5 Cultura e expansão de células-tronco mesenquimais.....	52
5.6 Caracterizações das matrizes 3D a base de quitosana, gelatina e condroitina.....	53
5.6.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	53
5.6.2 Ensaio reológico.....	54
5.7 Estudos in vitro.....	55
5.7.1 Caracterização de ADSC por citometria de fluxo.....	55
5.7.1.2 Marcação celular com anticorpos primários e secundários.....	55
5.7.1.3 Leitura no FACScan.....	55
5.7.2 Imunofluorescência em células-tronco mesenquimais.....	56
5.7.3 Análise da osteogênese por RT-PCR.....	57
5.7.4 Teste de viabilidade celular – MTT.....	58
5.7.5 Ensaio da atividade da Fosfatase Alcalina.....	59
5.7.6 Ensaio de dosagem de colágeno total.....	60
5.7.7 Marcação por Tetraciclina.....	61
5.7.8 Coloração por Von Kossa.....	61
5.8 Estudos in vivo.....	61
5.8.1 Avaliação da Biocompatibilidade da matriz 3D através de	



implantes em tecido subcutâneo de ratos.....	61
5.8.2 Defeito crítico em calotas cranianas.....	63
5.8.3 Análise imunohistoquímica.....	64
5.9 Análise estatística.....	65
<b>6 Resultados.....</b>	<b>66</b>
6.1 Caracterização da matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina.....	67
6.2 Estudos in vitro.....	68
6.2.1 Morfologia e cultivo de ADSC.....	68
6.2.2 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo e imunofluorescência.....	69
6.2.3 Análise da colonização da matriz 3D por de células- tronco mesenquimais.....	71
6.2.4 Análises das culturas de células-tronco mesenquimais em monocamada (2D) e matriz 3D.....	72
6.2.5 Metabolização do MTT.....	74
6.2.6 Atividade da Fosfatase Alcalina.....	76
6.2.7 Dosagem de colágeno total.....	78
6.2.8 Coloração de estruturas mineralizadas.....	80
6.2.9 Análise da osteogênese de ADSC por citometria de fluxo e imunofluorescência.....	83
6.2.10 Análise da osteogênese por RT-PCR.....	83
6.3 Estudos in vivo.....	85
6.3.1 Avaliação da Biocompatibilidade in vivo da matriz 3D através de implantes subcutâneos.....	85
6.3.2 Implantes em lesões de calvárias.....	91
<b>7 Discussão.....</b>	<b>97</b>
<b>8 Conclusão.....</b>	<b>113</b>
<b>9 Referências bibliográficas.....</b>	<b>114</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada, as alternativas viáveis para o restabelecimento das funções normais do paciente baseiam-se na realização de cirurgias reconstrutivas, transplantes ou utilização de órgãos e tecidos artificiais (Rustad et al., 2010; Tabata, 2009; Ikada, 2006; Shin et al., 2003). Entretanto, essas técnicas apresentam importantes limitações. Na cirurgia reconstrutiva não há a substituição completa das funções biológicas e conseqüentemente, não há a prevenção da deterioração progressiva do tecido ou órgão acometido (Tabata, 2006). Em relação ao transplante de órgão ou tecido, há necessidade de aumentar a sobrevida do transplante no hospedeiro, reduzindo a resposta imune, por meio de terapia imunossupressora contínua e permanente (Ikada, 2006; Tabata, 2009). Essas restrições estimularam o desenvolvimento de terapias alternativas baseando-se na utilização de biomateriais.

Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e possuem características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos (Li et al., 2010; Tabata, 2009).

Desde a década de 1960, implantes temporários, confeccionados de polímeros bioreabsorvíveis, ganharam uma importância crescente na área médica, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como suturas cirúrgicas (Kulkarni et al., 1966) sistemas para liberação controlada de drogas (Liu et al., 2004) e dispositivos ortopédicos (Ambrose & Clanton, 2004).

Atualmente fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro. Embora muitos dispositivos protéticos artificiais estejam disponíveis, poucos podem substituir completamente todas as complexas funções biológicas (Tabata, 2009). Em situações clínicas mais severas, somente o transplante do órgão retoma as atividades orgânicas. Assim, de uma forma idealizada, a melhor alternativa seria obter um novo órgão ou tecido substituto àquele que não desempenha normalmente suas funções (Bhatia et al., 2010; Langer, 2004). Nos dias de hoje, a idéia da reconstrução de órgãos e tecidos criados em laboratório é amplamente difundida e investigada no mundo todo.

Recentemente a Engenharia de Tecidos emerge como um campo interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e ciências da saúde através do desenvolvimento de

substratos para reparo ou reconstituição de tecidos e órgãos (Bhatia et al., 2010; Willians, 2006).

A proposta desta nova área da medicina regenerativa consiste em combinar células, matriz suporte e agentes bioativos para a regeneração de um novo tecido funcional. O intuito da incorporação de uma matriz suporte nessa abordagem é providenciar um arcabouço estrutural que retenha as células na área defeituosa até que elas secretem sua própria matriz. Proporcional e concomitantemente à secreção de matriz extracelular (MEC), a matriz suporte será degradada e o tecido reparado (Ma et al., 2009; Tabata, 2009; Ikada, 2006; Lysaght & Hazlehurst, 2004).

No campo da ortopedia, o uso de implantes bioabsorvíveis está se tornando mais freqüente (Ma et al., 2009; Rosa et al., 2008) . Os avanços na ciência dos polímeros têm permitido a produção de implantes com a força mecânica necessária para tais procedimentos. Os materiais bioabsorvíveis têm sido utilizados para a fixação de fraturas, assim como na fixação de partes moles (Ma et al., 2009; Rosa et al., 2008).

Dentre os polímeros naturais utilizados na construção de matrizes porosas aplicadas à engenharia de tecidos, incluindo a de ossos e outros tecidos mineralizados destacam-se a quitosana, gelatina e condroitina, por apresentarem excelentes propriedades biológicas complementares (Hutmacher, 2000). Estudos anteriores de quitosana-gelatina enfocaram principalmente a preparação e a caracterização de diferentes blendas do biomaterial.

No presente trabalho, desenvolvemos uma matriz 3D porosa, natural e de baixo custo, constituída de quitosana, gelatina e condroitina, que foi colonizada por células-tronco mesenquimais e transplantada para defeitos ósseos na calvária de ratos. Portanto, esse estudo tem como finalidade apresentar um novo biomaterial com características ideais a Engenharia de Tecidos, unido ao potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e sua aplicação na reconstrução do tecido ósseo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um dos componentes mais resistentes e rígidos do corpo humano. Constituinte principal do esqueleto fornece suporte para partes moles e protege órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células sanguíneas. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis. Além disso, exerce função metabólica já que funciona como depósito de cálcio, fósforo e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, a fim de manter constante a concentração desses íons nos líquidos corporais (líquido intersticial, sangue e linfa) (Porter et al., 2009; Hadjidakis & Androulakis, 2006; Long, 2001; Blair et al., 1986).

A organização hierárquica do osso varia de acordo com diferentes locais no esqueleto, portanto suas propriedades biomecânicas variam consideravelmente (Freshney et al., 2007; Goldstein et al., 2005). Macroscopicamente o tecido ósseo é composto por osso cortical, correspondente a 80% dos ossos no organismo humano, mas ocupa apenas 50% da área, sendo encontrado principalmente na diáfise dos ossos longos. O osso cortical é uma estrutura densa, possuindo apenas 10% de porosidade, com elevada resistência mecânica. O restante da área é ocupada pelo tecido ósseo esponjoso, que corresponde aos demais 20% dos ossos. Este tipo ósseo é uma rede que de macroporos com 55 a 90% de porosidade interconectada (Hadjidakis & Androulakis, 2006; Salgado et al., 2004). Quanto ao metabolismo, o osso esponjoso é oito vezes mais ativo, apresentando maior remodelação.

A hierarquia das células precursoras do tecido ósseo é mais bem compreendida se dividida em estágios de desenvolvimento: i) células-tronco mesenquimais, capazes de se diferenciar em vários tipos de linhagens celulares; ii) células osteoprogenitoras, responsáveis pela expansão do número de osteoblastos em resposta a um número de fatores de crescimento mitótico, mas desprovidas da capacidade de auto-renovação; iii) pré-osteoblastos que representam células em um estágio de transição entre células osteoprogenitoras; iv) osteoblastos, células cuboidais uninucleadas que sintetizam os componentes da matriz extracelular e são responsáveis por sua mineralização; v) osteócitos, osteoblastos aprisionados pela matriz óssea que ocupam um espaço denominado de lacuna osteocítica; vi) osteoclastos, células multinucleadas de origem

monocítica envolvidas na reabsorção da MEC óssea (Porter et al., 2009; Long, 2001; Sommerfeldt & Rubin, 2001).

Muitos caminhos de sinalização tem se mostrado de fundamental importância na comunicação inter-osteoblastos (Nomura et al., 2000), gerando um campo de resposta muito maior do que o sítio estimulado. Células ósseas são organizadas em uma rede de interconecção que se estende dos osteócitos enclausurados na matriz até os osteoblastos presentes na superfície óssea (Turner et al., 2002).

O microambiente ósseo permite e promove funções celulares que levam à produção de matriz óssea e ossificação. A matriz é um sistema bioquímico ativo e dinâmico que transmite importantes fatores regulatórios para as células vizinhas, afeta a expressão de genes e mudanças nos níveis citoestruturais. Este ambiente bioquímico interfere na migração, adesão, proliferação e diferenciação celulares, além da transcrição e transdução (Allori et al., 2008a). Os componentes da MEC regulam a nucleação e a mineralização, assim como armazenam os fatores de crescimento para uso futuro (Allori et al., 2008b). A matriz óssea é constituída por 25% de parte orgânica, que compreende as células (2-5%) e osteóide (Tabela 1), 70% de parte inorgânica, composta por hidroxiapatita e 5% de água (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

Esses componentes estão organizados em modo tridimensional formando as trabéculas ósseas que conferem ao osso o design necessário para desempenhar as funções de suporte, proteção de órgãos internos, alojamento da medula óssea, locomoção e de reservatório de minerais. O osso é sistemicamente controlado por fatores hormonais e localmente regulado por forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas (Allori et al., 2008c).

**Figura 1.** Proteínas constituintes da parte orgânica da matriz óssea.

Proteínas	Propriedades e funções
Colágeno tipo I	Compõe 90% da matriz orgânica óssea; fornece a estrutura, na qual minerais ósseos são depositados (Mackie, 2003 e Salgado <i>et al.</i> , 2004)
Sulfato de condroitina – decorina	Proteoglicana; co-localizada com colágeno tipo I; regula a fibrogênese do colágeno (Mackie, 2003)
Sulfato de condroitina – biglicana	Proteoglicana; localização pericelular; modula a resposta de precursores de osteoblastos ao TGF- $\beta$ (fator indutor de formação óssea) (Mackie, 2003)
Osteonectina/SPARC	Glicoproteínas; regulam a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Mackie, 2003)
Tenascina-C	
Fibronectina	
Membros da família da trombospondina	
Osteopontina	Glicoproteína; regula a adesão celular (osteoblasto e osteoclasto) (Sikavitsas <i>et al.</i> , 2001 e Mackie, 2003), a mineralização e está envolvida no remodelamento ósseo (Davies, 1996 e Salgado <i>et al.</i> , 2004)
Sialoproteína óssea	Glicoproteína; núcleo para mineralização e regula adesão celular (Davies, 1996)
Osteocalcina	Proteína $\gamma$ -carboxilada (Gla); envolvida no remodelamento ósseo, estabiliza a matriz de hidroxiapatita e previne mineralização excessiva (Sikavitsas <i>et al.</i> , 2001; Mackie, 2003; Salgado <i>et al.</i> , 2004)
Fosfatase alcalina	Polipeptídeo; promove formação de cristais na matriz por remover inibidores de núcleos de mineralização (Sikavitsas <i>et al.</i> , 2001)

O osso é um tecido metabolicamente ativo que se encontra em constante remodelamento durante toda a vida do organismo. Estima-se que o esqueleto adulto seja totalmente renovado a cada quatro anos (Parfitt, 2002). A remodelação óssea ocorre em áreas chamadas de unidades multicelulares devido à ação coordenada de osteoblastos, células responsáveis pela produção de matriz óssea e de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção da mesma (Long, 2001). Este mecanismo mantém a estrutura óssea de acordo com as necessidades mecânicas, repara micro danos ocorridos na matriz óssea levando a renovação do tecido e exerce papel importante na homeostasia de minerais (Hadjidakis & Androulakis, 2006). O remodelamento ósseo é regulado sistemicamente por hormônios e localmente por citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (Hadjidakis & Androulakis, 2006), assim como por estímulo mecânico (Sommerfeldt & Rubin, 2001). Uma disfunção nessa regulação pode causar uma variedade de doenças que resultam, em raros casos, no aumento da formação óssea como a osteopetrose (Raisz, 1999) e na maioria das vezes em excessiva degradação óssea, como na osteoporose (Kanis, 2002), hiperparatireoidismo e hipertireoidismo,

doença de Paget, doença periodontal e na imobilização (Raisz, 1999). A perda óssea ocorre também em fraturas extensas, cirurgias ortopédicas, infecções, resecção de tumores (Dimitriou et al., 2011) e em desordens genéticas como na osteogênese imperfeita, na qual um dos genes para colágeno tipo I encontra-se mutado (Gajko-Galicka, 2002; Venturi et al., 2006).

Perdas e danos desse tecido constituem grave problema de saúde pública. Milhões de brasileiros sofrem, atualmente, com problemas relacionados a lesões músculo-esqueléticas.

### **2.1.2 Injúrias acometidas ao tecido ósseo**

Com o aumento da expectativa de vida das populações de uma forma geral estima-se que também aumente o número de indivíduos afetados por doenças crônico-degenerativas, como a osteoporose, doença de Paget e osteogênese imperfeita, dentre outras (Aires, 2008). Estas doenças, sobretudo a osteoporose, representam um grave e importante problema de saúde (Christenson, 1997).

A osteoporose é uma doença caracterizada pela deterioração microestrutural do tecido ósseo devido à perda de osteóide, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas. Manifesta-se principalmente por fraturas vertebrais, femorais e de quadril (Kawai et al., 2011; Peggy, 2011). Essa doença afeta indivíduos de ambos os sexos, normalmente com idades entre 51-75, porém a prevalência é maior em mulheres que homens. A osteoporose é geralmente considerada uma doença de fácil prevenção, mas de difícil reversão (Parfitt, 1988). Mesmo assim, milhões de pessoas sofrem com a doença no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que, por volta dos 65 anos de idade, um quarto das mulheres deve ter osteoporose e mais de 70% vão desenvolvê-la após os 80 anos. Além disso, 10% das mulheres afro-americanas têm osteoporose.

Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (2010), 10 milhões de brasileiros sofrem de osteoporose, e uma a cada três mulheres com mais de 50 anos tem a doença. Apesar de atingir mais o sexo feminino, a osteoporose também pode acometer os homens e pessoas mais novas. Estima-se que cerca de 15% dos jovens adultos brasileiros (acima de 19 e abaixo de 59) sofram do problema no país. Além disso, no Brasil, somente uma pessoa em três com osteoporose é diagnosticada e, destas, somente uma em cinco recebe algum tipo de tratamento (Zavaglia et al., 2001). Em



2008, o Ministério da Saúde gastou cerca de R\$ 39 milhões com medicamentos para tratamento da osteoporose.

A doença de Paget surge como a doença óssea metabólica mais comum após a osteoporose. É caracterizada por regiões de excessiva remodelação óssea com alta atividade dos osteoclastos, apresentando anormalidades em todas as fases de remodelação. A causa da doença de Paget ainda é um tema controverso, mas sabe-se que a patogênese da doença está relacionada com fatores genéticos e ambientais (Schoenfeld et al., 2010; Hansen et al., 1999; Huvos, 1986). Estima-se que até 10% da população mundial acima de 60 anos tenha a doença (OMS). No Brasil, cerca de 80.000 pessoas sofrem com a doença de Paget, que ainda é subdiagnosticada (Ministério da Saúde)

Outra desordem de grande relevância é a Osteogênese Imperfeita. Esta doença constitui-se de uma mutação genética que afeta a capacidade dos osteoblastos em sintetizar normalmente colágeno tipo I (Marijanovic et al., 2010; Appolonio et al., 2003) e possui incidência de 1 em 15.000 nascimentos (Fano et al., 2010). No Brasil, estima-se haver cerca de 12.000 portadores da doença segundo a Associação Brasileira de Osteogênese Imperfeita (2011). O tratamento inclui desde a intervenção cirúrgica para a colocação de próteses intramedulares objetivando a estabilização dos ossos, até o uso de bifosfonados para maximizar a função do tecido. Atualmente terapias celulares e gênicas têm sido investigadas como potenciais tratamentos para a doença. Células-tronco mesenquimais de doadores saudáveis foram administradas em cinco crianças contendo uma forma severa da osteogênese imperfeita e, 3 meses após o tratamento, o conteúdo mineral do osso destas crianças aumentou de 44 a 77% (Horwitz et al, 2001; Horwitz et al, 1999).

Além das desordens citadas acima, fatores externos como queda, violência urbana, acidentes domésticos, lesões autoprovocadas e demais causas, ocupam papel de destaque dentre as principais causas de lesão do tecido ósseo. No Brasil, entre 2005 e 2008, aumentou em 8% o número de internações hospitalares na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) por fraturas de fêmur. Outros comprometimentos devem ser ainda mencionados como trauma na coluna tóraco-lombar e perda parcial ou total do osso alveolar, suporte dos dentes em seres humanos.

A capacidade de regeneração intrínseca do osso sem formação de cicatriz, através do remodelamento ósseo, é conhecida (Sommerfeldt & Rubin, 2001). No

entanto, nas situações em que esse processo encontra-se comprometido ou insuficiente ou que o defeito ósseo excede o tamanho crítico, resultando em sua não união, os processos naturais de reparo ósseo não são suficientes para restaurar a integridade do tecido (Kraus & Kirker-Head, 2006). Assim, a busca por um mecanismo capaz de reparar o tecido ósseo lesionado desperta grande interesse na comunidade científica.

### **2.1.3 Reparo tecidual ósseo**

A reparação tecidual óssea é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. Frequentemente, essa reparação é mais lenta em relação à separação de tecidos moles, devido a diferente morfologia e composição entre os tecidos. O tecido ósseo possui uma enorme capacidade de regeneração na maioria dos casos, o que possibilita a restauração de sua arquitetura e função original. No entanto, existem algumas condições que dificultam essa capacidade de regeneração e a completa reparação pode não ocorrer, caso não haja um bom suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, ou ocorra alta proliferação de outros tecidos locais (Pinheiro et al., 2003).

Dentre as alternativas disponíveis para os procedimentos cirúrgicos ligados à reconstrução óssea, destacam-se os enxertos autólogo, aloenxerto, xenoenxerto e os biomateriais, sozinhos ou como construtos.

O tratamento padrão ouro, atualmente empregado, é o enxerto autólogo ou autotransplante. Esse osso pode ser coletado em diversos sítios, sendo o sítio doador mais comum a crista ilíaca da pelve (Dimitriou et al., 2011). O osso autólogo combina as principais propriedades requeridas em um material para reposição óssea como osteoindução, osteocondução e osteogênese (Giannoudis et al., 2005). Uma vez que utiliza osso do próprio paciente, esse tipo de enxertia é ainda não imunogênica e não há risco de transmissão de doenças. No entanto, acarreta em um procedimento cirúrgico adicional ao paciente, podendo implicar em possíveis infecções (Dimitriou et al., 2011) e seqüela estética e/ou funcional da área doadora (Tabata, 2009; Bauer et al., 2000; Bostwick and Jones, 1994) Além disso, a viabilidade dos enxertos pode ser afetada por fatores que comprometam o suprimento vascular como, por exemplo, diabetes e tabagismo, podendo levar ao insucesso do procedimento (Nahabedian et al., 2004). Entretanto, a principal desvantagem dessa técnica é a difícil obtenção de quantidades suficientes de tecido para enxerto na maioria dos pacientes, o que inviabiliza a

restauração de grandes perdas ósseas (Tabata, 2009; Hui et al., 2005; Salgado et al., 2004).

Um dos maiores problemas dos aloenxertos é a escassez de doadores de tecidos e órgãos. Além disso, juntamente com os xenoenxertos, a contínua e permanente utilização de agentes imunossupressores a fim de evitar respostas imunológicas de rejeição, muitas vezes provoca efeitos secundários, tais como a grande possibilidade de infecção bacteriana e carcinogênese (Dimitriou et al., 2011; Tabata, 2009; Liu et al., 2007). Esse tipo de enxertia apresenta também grande risco de transmissão viral (Tabata, 2009; Rosa et al., 2008; Hui et al., 2005; Eastlund et al., 1995).

Alternativamente, dispositivos biomédicos têm sido empregados, a exemplo de próteses de silicone. Entretanto, estes podem promover reação do tipo corpo estranho, infecção, extrusão, ruptura e contratatura capsular, causando dor e deformidade, obrigando, às vezes, à remoção do implante (Locke et al., 2010; Tabata, 2009; Bauer et al., 2000). Ademais, tais dispositivos não podem substituir totalmente as funções biológicas, mesmo por um único tecido ou órgão e, conseqüentemente, não impedem a deterioração progressiva da lesão (Locke et al., 2010; Tabata, 2009).

Outros métodos tradicionais, tais como pinos intramedulares, revestimentos e fixadores externos não exigem a implantação de enxerto ósseo, no entanto, dependem do local onde aconteceu a lesão para a síntese do osso. Conseqüentemente, defeitos ósseos que comprometam a recuperação total do osso lesado, beneficiar-se-iam das terapias baseadas em células que possuem potencial osteogênico que seriam transferidas para o local da perda óssea.

Devido às desvantagens da enxertia, se tornou extremamente necessária a busca por alternativas de reparo tecidual que fossem clinicamente suaves ao paciente (Zonari et al., 2012; Dimitriou et al., 2011). Um novo processo terapêutico, no qual a reposição do tecido lesionado seja alcançada a partir do potencial natural de cura dos pacientes, tem sido explorado.

O advento da biologia molecular e celular trouxe importantes conhecimentos sobre o processo de diferenciação celular, interação entre diferentes tipos celulares, a conexão entre estas e a matriz extracelular e a atuação de fatores bioativos. Além disso, os progressos na biologia celular, principalmente no campo das células tronco, têm chamado a atenção para alguns fatores de crescimento indicando que eles podem ter um

papel central na diferenciação e proliferação de tipos específicos de células (Li et al., 2010; Arosarena, 2005; Chen et al., 2004; Cancedda et al., 2003).

Esses novos conhecimentos permitiram o surgimento da Engenharia de Tecido, uma nova e estratégica área com características multidisciplinares. Essa tecnologia inovadora busca criar condições ideais para a regeneração e/ou a substituição de tecidos lesados, fornecendo elementos celulares, fatores de crescimento e diferenciação e, também, estruturas supramoleculares que permitam aos tecidos tratados uma adequada organização celular espacial e funcional, assim como sua integração sistêmica (Ikada, 2006; Langer e Vacanti, 1993).

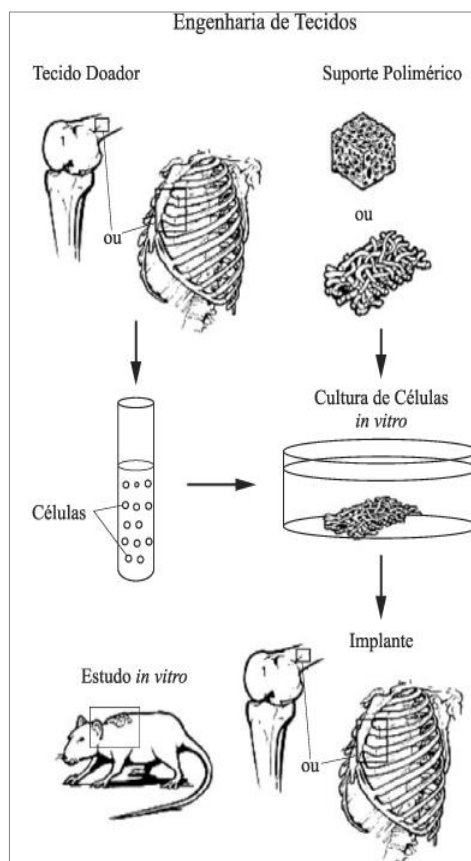
## **2.2 Engenharia de Tecidos**

A formação dos diversos órgãos e tecidos que compõem o corpo humano, seja durante a embriogênese ou no processo de regeneração e reparo de lesões, é um conjunto de eventos complexos nos quais células se agrupam em unidades funcionais gerando uma matriz extracelular e promovendo a formação ou crescimento de um tecido especializado (Bagby & Mannoni, 2004). Reproduzir estes eventos fora do corpo humano através de métodos que controlem e estimulem o crescimento de tecidos *ex vivo* é um desafio para a medicina regenerativa (Langer & Vacanti, 1993), tendo recentemente originado uma nova área denominada por Engenharia de Tecidos.

Assim, a Engenharia de Tecidos é uma área de pesquisa emergente que aplica princípios de engenharia e ciências da saúde através do desenvolvimento de substratos para reparo ou reconstituição de tecidos e órgãos. Conceitualmente, Engenharia de Tecido é baseada na criação de um novo tecido, semelhante ao tecido perdido, através da regeneração induzida ou da persuasão do organismo na sua própria cura, através do endereçamento, ao local apropriado, de promotores de regeneração, tais como: células, moléculas sinalizadoras, sinais mecânicos e uma estrutura de suporte (Williams, 2006).

Essa alternativa enfatiza o estudo e a aplicação da reparação de órgãos e tecidos utilizando um biomaterial (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, *scaffolds*, estruturas) associado a células e fatores estimulantes apropriados formando um construto capaz de promover a regeneração dos tecidos e acelerar o processo de cura (Figura 2) (Bhatia, 2010; Tabata, 2009; Arosarena, 2005; Chen et al., 2004; Langer & Vacanti, 1999). Portanto, trata-se de um campo interdisciplinar e emergente, envolvendo biologia celular e ciência dos materiais para o desenvolvimento de

substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido lesados ou acometidos por patologias, ao invés de apenas repará-los (Langer e Vacanti, 1993; Xiao et al., 2003; Shin et al., 2004, Hutmacher, 2000).

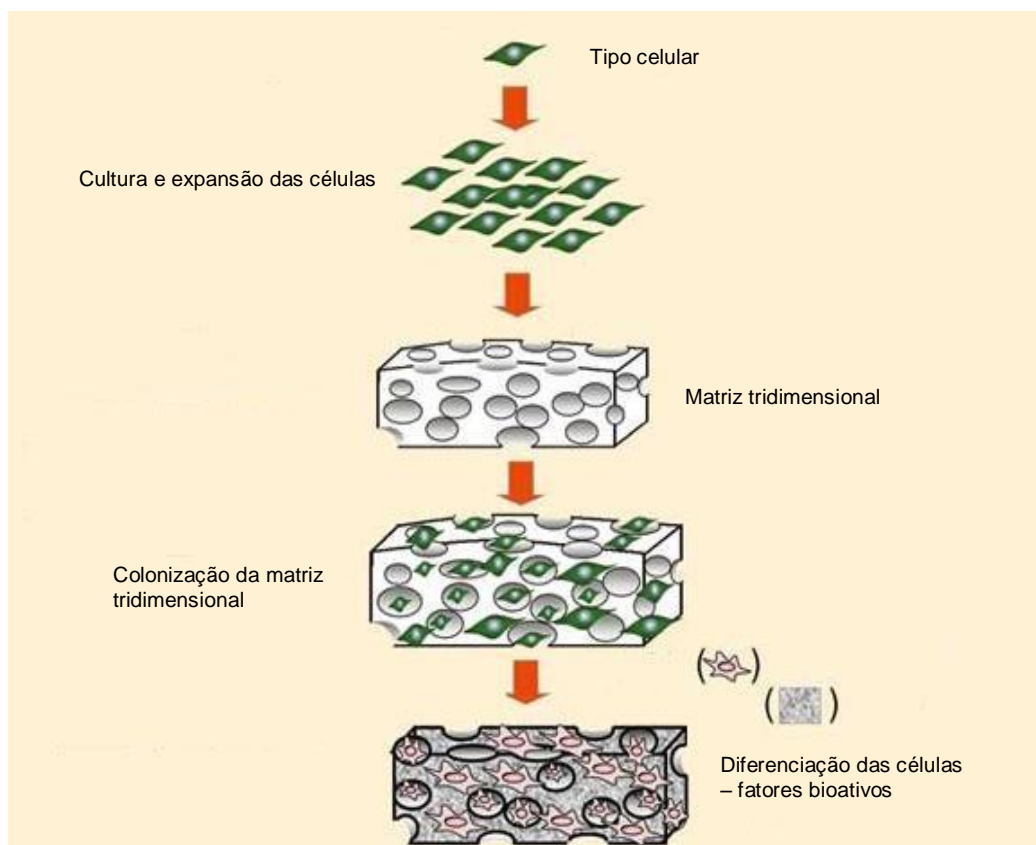


**Figura 2:** Técnica de Engenharia de Tecido (Barbatini, 2005).

A utilização de transplante celular para o organismo através de injeções ou infusões é uma técnica já testada atualmente. No entanto, poucas células ficam retidas no local da lesão, sendo a taxa enxertada baixa devido à excreção e morte celular (Tabata, 2009). Essas dificuldades causam, muitas vezes, a ineficácia terapêutica do transplante de célula. Para superar esses problemas, é necessário fornecer às células um ambiente propício à sua sobrevivência, eficiência funcional e fixação na lesão.

O uso de biomateriais associados às células, além de facilitar a inserção e recolocação das mesmas no organismo, é uma ferramenta ideal para promover a estabilização precoce da lesão. Por este motivo, a engenharia de tecidos surge como uma alternativa à injeção de uma suspensão de células ou fatores de crescimento para a regeneração de lesões (Tabata, 2009; Tabata, 2008; Bagby & Mannoni, 2004; Francis Shu & Matthew, 2000).

O conceito básico da engenharia de tecidos baseada em biomateriais foi originalmente introduzido por Langer & Vacanti (1993). Posteriormente, Young e Lucas, em 1998, propuseram um modelo (Figura 3) para a engenharia de tecidos baseado num sistema de três componentes estruturais e interdependentes, sendo i) tipo celular; ii) fatores bioativos e iii) matrizes tridimensionais.



**Figura 3** – Esquema representativo dos princípios da engenharia de tecidos (Ng et al., 2005)

### i) Tipo Celular

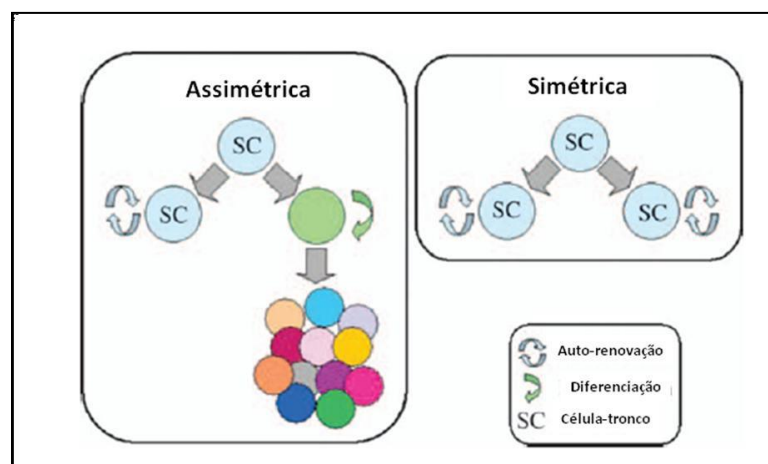
O princípio básico da engenharia de tecidos no campo da pesquisa voltada para a engenharia óssea é a formação de um novo osso *in vitro* e *in vivo* através da combinação de células osteopotentes cultivadas em materiais osteocondutivos para gerar um construto (Zhu et al., 2006; Hutmacher e Garcia, 2005).

A fonte de células empregada na engenharia de tecidos exerce um papel essencial para o seu sucesso. Estas podem ser recrutadas do próprio receptor (autólogas) ou ser fornecidas exogenamente (alogênicas e xenogênicas). As células autólogas são mais atraentes no uso clínico, já que elas não apresentam risco de rejeição imunológica, enquanto células de origem alogênica e xenogênica necessitam de terapias

imunossupressoras. Porém, a aplicação de células especializadas é limitada, pois não são capazes de serem expandidas e coletadas em quantidade suficiente para o tratamento clínico. Além disso, a disponibilidade limitada dessas células em situações em que o paciente encontra-se severamente acometido por uma doença ou em avançada idade intensificou o interesse na abordagem e utilização de células de origem diversificada (Ikada, 2006).

Independente da sua fonte, as células-tronco têm apresentado um grande potencial para aplicação terapêutica e Engenharia de Tecidos devido ao seu potencial de auto-renovação, diferenciação em diversas linhagens celulares, cultivo *in vitro* durante longo período sem apresentar senescência e baixa antigenicidade (Anisimov et al., 2007; Kulterer et al., 2007; Park et al., 2006; Hashimoto et al., 2006; De Gemmis et al., 2006; Zuk, 2002).

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares (Gepstein, 2002). A capacidade de auto-renovação *in vivo* por tempo prolongado garante uma população de células-tronco capaz de manter a viabilidade e a funcionalidade dos tecidos ao longo da vida do organismo. (Rodriguez, 2005 e revisado por Nardi, 2006 e Mountford, 2008). Células somáticas são capazes de se renovar através de divisão simétrica, onde as duas células-filhas são idênticas genética e fenotipicamente à célula-mãe. Essas células podem também se dividir de forma assimétrica, em que uma das células-filha é genética e fenotipicamente igual à célula-mãe e a outra célula-filha se altera iniciando o processo de diferenciação (Mountifourd, 2008) (Figura 4). Dessa forma, a quantidade celular disponível é ilimitada.



**Figura 4** - Esquema explicativo dos tipos de divisão de células-tronco (adaptado de Mountifourd, 2008).

As células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto. Elas podem ser classificadas em três grandes grupos pelo grau de diferenciação: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Wagers & Weissman, 2004).

O ovócito fecundado e as células do blastômero são considerados células-tronco totipotentes uma vez que possuem a capacidade de gerar todos os tipos celulares de um organismo, incluindo os anexos embrionários (Chuang et al., 2003).

Células classificadas como pluripotentes, extraídas da massa interna do blastocisto, originam tipos celulares derivados dos três folhetos germinativos: endoderma, ectoderma e mesoderma e são representadas pelas células-tronco embrionárias (ESC). Esse tipo celular produz os fatores de transcrição Oct-4, Nanog e Sox2 responsáveis pela manutenção do estado de pluripotência (Gokhale & Andrews, 2009).

O isolamento de linhagens de células-tronco pluripotentes humanas alimentou a imaginação e a esperança da comunidade científica e médica. No entanto, essas células exibem um potencial de formação de teratomas quando introduzidas em camundongos imudeficientes. Dessa forma, limita-se a sua utilização em humanos até que se conheçam métodos eficientes de diferenciação e seleção celulares (Minami et al., 2007). Além disso, sua obtenção e utilização geram questionamentos éticos, políticos e religiosos (Fischbach e Fischbach, 2004).

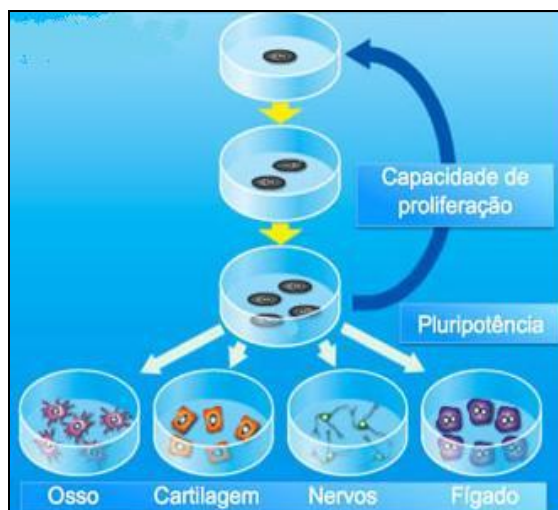
Uma fonte alternativa às células-tronco embrionárias bastante promissoras são as células-tronco de pluripotência induzida. Takahashi e Yamanaka (2006) demonstraram que através de manipulações genéticas, é possível reverter o processo de diferenciação de uma célula adulta. Através da indução da expressão de fatores como Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog e Lin células diferenciadas podem retornar ao estado de pluripotência semelhante às células-tronco embrionárias. Embora essas células demonstrem ser uma fonte promissora de células autólogas para utilização na medicina regenerativa, vários aspectos sobre a indução, cultivo e manutenção das mesmas ainda devam ser esclarecidos.

Uma excelente alternativa aos problemas expostos é a utilização de células-tronco adultas. Essas células são consideradas multipotentes, devido à sua capacidade em formar linhagens celulares típicas de tecidos provenientes dos três folhetos germinativos. Inicialmente, acreditava-se que as células-tronco adultas só se diferenciavam em linhagens celulares do tecido ao qual residem. No entanto, sob



condições especiais, estas células podem sofrer processo de transdiferenciação originando tipos celulares especializado de outro tecido ou de outro folheto germinativo (Kaps et al., 2002). Apesar disso, estas células tendem a originar tipos celulares característicos do tecido em que se encontram inseridas (Singer & Caplan, 2011; Volarevic et al., 2011; Li et al., 2010; Kirschstein & Skirboll, 2001).

Para ser caracterizada como uma célula-tronco adulta, esta deve possuir capacidade de autorrenovação *in vitro* e de diferenciação em pelo menos um tipo celular especializado. Devem também poder gerar tipos celulares maduros que têm morfologias, características e funções especializadas, ou seja, formar células inteiramente diferenciadas (Figura 5) (Placzek et al., 2009; Alhadlaq & Mao, 2004; Sugiura et al., 2004).



**Figura 5:** Potencial de autorrenovação (seta azul) e de diferenciação em multilinhagens (setas brancas) das células-tronco mesenquimais. (Adaptado De Gemmis, 2006).

Outra característica favorável à utilização de células-tronco adultas é sua baixa antigenicidade (Zuk et al., 2002). Essas células possuem baixa expressão de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e ausência de expressão de MHC de classe II, sendo assim possuem baixa capacidade de estimular células T mesmo na presença de aloantígenos. Além disso, estudos mostraram que essas células promovem um ambiente favorável à recuperação tecidual através do seu potencial imunorregulador. Moléculas participantes das vias pró e anti-inflamatórias estimulam células-tronco na secreção de fatores de crescimento que regulam a resposta imune. Por exemplo,  $INF\gamma$  estimula as células-tronco a produzirem e secretaremIDO (indoleamina 2,3-deoxigenase), uma enzima que cliva triptofano em kinurenina e conseqüentemente inibe a proliferação de células T (Ucelli, 2006).

De acordo com suas características, células-tronco adultas podem ser divididas em dois subgrupos: células-tronco hematopoiéticas (HSC, *Hematopoietic stem cells*), que originam componentes do sangue e do sistema imune e células-tronco mesenquimais (MSC, *Mesenchymal stem cells*), que normalmente originam osteoblastos, condrócitos, adipócitos, entre outras (Singer & Caplan, 2011; Placzek et al., 2009; Kirschstein & Skirboll, 2001). Segundo Kassem e colaboradores (2004), as MSC são as mais facilmente isoladas e cultivadas dentre os outros tipos de células tronco adultas. Ademais, demonstram estabilidade do fenótipo *in vitro*.

Células-tronco mesenquimais foram identificadas primeiramente nos estudos de Friedenstein & Petrakova (1966), que isolaram células progenitoras da medula óssea de camundongos. Essas células proporcionam, ao menos teoricamente, uma inesgotável fonte celular que, a depender do tipo e do fator de crescimento envolvido, podem originar vários tecidos do corpo, tais como ósseo (Miranda et al., 2011; Singer & Caplan, 2011; Li et al., 2010) cartilaginoso (Singer & Caplan, 2011; Breyner et al., 2009), muscular (Singer & Caplan, 2011) e adiposo (Singer & Caplan, 2011; Locke et al., 2010). São comumente definidas como células multipotentes, com capacidade de diferenciarem em um ou mais tipos de células especializadas. Em bases teóricas, podem ser retiradas de um determinado paciente, incorporadas em matriz tecidual *ex vivo* e implantadas no mesmo indivíduo quando o reparo tecidual se tornar essencial, evitando-se medidas protocolares de imunossupressão (Singer & Caplan, 2011). Durante a incorporação, sofrem diferenciação pela indução de alterações nas condições de seu cultivo, ou ainda, *in vivo*, em consequência do estabelecimento de novo microambiente fisiológico na área transplantada (Friedenstein & Lalykina, 1970). Nesta abordagem evidencia-se que células indiferenciadas retiradas a partir de tecidos adultos, exibem uma capacidade de proliferação muito limitada, não originando teratomas.

Células-tronco mesenquimais representam uma fração muito pequena, 0,001-0,01% (aproximadamente 1 para cada 10.000 a 15.000 células) da população total de células nucleadas da medula óssea (Augello et al., 2010; Pelacho et al., 2010; Wilson et al., 2010). Entretanto, podem ser isoladas e expandidas com eficiência elevada e ser induzidas à diferenciação em múltiplas linhagens celulares sob definidas condições de cultura, o que as torna ideais na aplicação da medicina regenerativa (Augello et al., 2010; Li et al., 2010; Wilson et al., 2010; Kassen et al., 2004; Barry & Murphy, 2001).

Esses tipos celulares são descritos como possuindo aderência seletiva à superfícies plásticas, com morfologia fibroblástica e capazes de formar colônias *in vitro*.

Daí o termo Cfu-f (*colony-forming unit-fibroblast*), medida usada para estudar a proliferação de células em culturas (Augello et al., 2010; Pelacho et al., 2010; Placzek et al., 2009; Kassem et al., 2004; Conrad et al., 2004; Caplan & Bruder, 2001). MSC, em contraste a outros tipos de células que expressam marcadores de superfícies específicos, possuem marcadores comuns a múltiplas linhagens celulares, incluindo marcadores de células mesenquimais, endoteliais, epiteliais, e musculares (Madonna et al., 2009; Alhadlaq & Mao, 2004). Entretanto, estas células expressam Stro-1,  $\beta$ 1-integrina, CD90, CD 73, CD 54 e CD105, mas não CD 34 e CD 45, típicos de células-tronco hematopoiéticas (Augello et al., 2010; Madonna, 2009; Placzek et al., 2009). Ainda, outro fator de identificação das MSC é a positividade à reação com fosfatase alcalina (Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010; Locke et al., 2010; Placzek et al., 2009 Machado et al., 2007), fibronectina e reação negativa para esterase (Prasad et al., 2005).

De todos os órgãos descritos como fonte de células tronco, a medula óssea foi estudada com maior detalhe. Embora a medula óssea seja a fonte mais universal de MSC, o processo de obtenção destas células é um método invasivo, com certo grau de morbidade, resultando da punção medular, baixo rendimento destes tipos celulares (Pelacho et al., 2010; Wilson et al., 2010; Zuk et al., 2001).

Devido a estas limitações iniciou-se a busca por tecidos que pudessem servir como fonte para a obtenção dessas células em larga escala, com anestesia local e mínimo desconforto (Wilson et al., 2011; Pelacho et al., 2010; Hattori et al., 2004).

Da mesma forma que a medula óssea, o tecido adiposo é derivado do mesoderma embrionário, além de ser abundante no organismo é facilmente acessível. Esse tecido contém uma população mesenquimal que pode ser facilmente isolada (Wilson et al., 2011; Yarak & Okamoto, 2010; Strem et al., 2005; Ogawa et al., 2003). Esta população, denominada Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo (ASC, *Adipose Tissue Derived Stem Cells*), compartilha várias características das células-tronco de medula óssea no que se refere à morfologia, à capacidade de proliferação e à diferenciação em multilinhagens celulares (Pelacho et al., 2010; Strem et al., 2005; Zuk et al., 2001). Essas células apresentam morfologia fusiforme, semelhantes a fibroblastos, são capazes de se aderir à superfície plástica da placa de cultivo e através de estímulos adequados são capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares (Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001).

Já há alguns anos, vários autores têm demonstrado o potencial de multilinhagem dessas células diferenciando-as em linhagens cardiomiogênicas (Planat-

Bernard et al., 2004), neurogênicas (Fujimura et al, 2005), adipogênicas (Rodrigues et al., 2004), osteogênica e condrogênica (Ogawa et al., 2004) *in vitro* (Figura 5). Dessa forma, o tecido adiposo foi identificado como reservatório de células tronco mesenquimais.

Embora inúmeros outros tecidos também contenham células-tronco (Zonari et al., 2012, Gomide et al., 2011; Young et al., 1995) o tecido adiposo apresenta indiscutíveis vantagens como fonte, pela facilidade de obtenção, baixa morbidade e elevado rendimento celular (Zonari et al., 2012; Wilson et al., 2011; Zuk et al., 2001). A lipoaspiração de depósitos de gordura subcutânea é uma técnica que pode ser realizada com anestesia local e mínimo desconforto. Ainda, mostra-se como um procedimento de riscos e custos muito baixos, podendo acrescentar benefício estético (Wilson et al., 2011; Pelacho et al., 2010; Hattori et al., 2004; Zuk et al., 2001). Enquanto na medula óssea o rendimento é de 100 a 1.000 Cfu-f por mililitro de medula, no tecido adiposo é aproximadamente 5.000 Cfu-f por grama de tecido: uma célula-tronco para cada  $10^5$  células mesenquimais (Augello et al., 2010; Strem et al., 2005; Kirschstein & Skirboll, 2001; Zuk et al., 2001).

Na medicina ortopédica há vários exemplos de como as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo podem ser utilizadas com sucesso, para a regeneração óssea e cartilaginosa. Estes exemplos incluem a regeneração da coluna vertebral (Muschler et al., 2003), a reparação óssea (Gomide et al., 2011), a reparação de defeitos em cartilagens (Breyner et al., 2009; Ponticello et al., 2000) e tendões (Young et al., 1998).

## **B – Fatores Bioativos**

Assim como o tipo celular, os fatores bioativos podem ser autólogos ou fornecidos de forma exógena. As células podem ainda ser pré-tratadas, *ex vivo*, com fatores bioativos ou modificadas geneticamente (Zonari et al., 2012; Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2009; Machado et al., 2007; Lucas et al., 1990). Estes fatores estimulam a diferenciação, produção de matriz extracelular e angiogênese necessária para nutrição e oxigenação; eventos cruciais para o reparo tecidual (Tabata, 2009). Entre exemplo de fatores bioativos, incluem: i) agentes proliferativos: fator de crescimento derivado de plaquetas; ii) agentes que induzem o comprometimento da célula com determinada linhagem: proteína morfogenética do osso, proteína

morfogenética da cartilagem, fator de crescimento de queratinócito, entre outros e iii) fatores inibidores ou indutores da diferenciação celular.

A capacidade das MSC se diferenciar em osteoblastos já foi extensivamente demonstrada através de vários estudos (Miranda et al., 2011; Machado et al., 2007; Dennis et al., 2007; Cancedda et al., 2003a). Células-tronco mesenquimais podem ser diferenciadas em osteoblastos, *in vitro*, na presença de dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato, vitamina C e D<sub>3</sub> (Locke et al., 2011; Miranda et al., 2011; Machado et al., 2007; Zuk et al., 2001).

O tratamento com o glicocorticóide sintético dexametasona estimula a proliferação e promove a diferenciação para a linhagem osteogênica (Cordonnier et al., 2010; Haynesworth et al., 1996).

Fosfatos orgânicos, tais como  $\beta$ -glicerofosfato também promovem a osteogênese através do seu papel na mineralização e modulação das atividades do osteoblasto (Locke et al., 2011). Fosfatos livres podem induzir a expressão de mRNA de proteínas características de osteoblastos, como a osteopontina. Além disso, estes fosfatos têm um efeito na produção e exportação nuclear do gene CFBA-1, um gene regulador da osteogênese (Beck et al., 2001; Fujita et al., 2001; Ducy et al., 1997). Outros suplementos tais como o ácido ascórbico e a vitamina D3 são comumente usados para a indução osteogênica por promoverem o aumento da atividade da fosfatase alcalina e a produção de osteocalcina (Locke et al., 2011; Placzek et al., 2010; Liu et al., 2004).

Em adição a estes suplementos, fatores de crescimento pertencentes à família das proteínas morfogênicas do osso (BMP- *bone morphogenetic protein*), são comumente usados para a osteoindução. Apenas a adição de BMP-2 é capaz de aumentar a formação de nódulos de mineralização e o conteúdo de cálcio presente nas culturas osteogênicas, *in vitro* e *in vivo* (Machado et al., 2007).

Apesar dos bons resultados obtidos apenas na utilização de fatores bioativos para a diferenciação osteogênica de MSC, estudos recentes indicam que estas células especializam-se melhor quando cultivadas em matrizes tridimensionais que mimetizam o ambiente tecidual. Além disso, apenas infusão celular não é capaz de formar um tecido funcional. Assim, uma gama de biomateriais tem sido desenvolvida a fim de proporcionar melhores resultados em relação à sobrevivência e diferenciação de células-tronco mesenquimais (Rustad et al., 2010; Ma et al., 2009; Cancedda et al., 2003).

## C – Matriz Tridimensional

O emprego de biomateriais com a finalidade de reparar tecidos lesados vem aumentando consideravelmente, graças à descoberta e ao desenvolvimento de novos materiais e a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação fisiológica desses com os organismos vivos (Tortelli & Cancedda, 2009). Convencionou-se denominar biomateriais (matrizes tridimensionais, arcabouços, *scaffolds*), os materiais que estejam em contato direto com os tecidos vivos, com o objetivo de substituí-los ou repará-los, sendo órteses, próteses, sondas e outros dispositivos.

Na criação dos biomateriais duas diferentes direções podem ser adotadas conforme o objetivo. Uma delas é criar biomateriais com superfície inerte de forma a não promover adesão celular, prevenindo ativação do sistema imune, coagulação sanguínea, trombose, deposição de MEC, além de outras interações entre o biomaterial e o microambiente do hospedeiro. Esse tipo de matriz, segundo Bacakova (2004), tem sido aplicado na construção de próteses articulares, lentes intraoculares, dispositivos de contato direto com o sangue, como válvulas cardíacas, próteses vasculares, cateteres para hemodiálise e também para o carreamento de drogas terapêuticas. A outra direção, ainda segundo esse mesmo autor, é considerada mais avançada e tem como objetivo o reparo tecidual. Para essa finalidade, são sintetizadas matrizes 3D que promovam interação direta com as células e o microambiente circundante. Dessa forma, é possível ocorrer adesão, migração, proliferação, diferenciação, deposição de MEC, além de viabilidade em longo prazo. Essa estratégia tem sido bastante explorada e utilizada na construção de vasos artificiais, ossos, cartilagens e órgãos parenquimatosos como pâncreas e fígado (Bakacova, 2004).

O desafio do campo dos biomateriais é criar dispositivos e implantes que substituam ou reparem tecidos vivos cujas características físico-químicas são resultado de milhões de anos de otimização evolutiva, e que têm capacidade de crescimento, regeneração e reparo. O controle da interface biomaterial-tecido é o problema supremo neste campo de ciência dos materiais (Henc, 2006). Dessa forma, para o desenvolvimento de matrizes, suas propriedades físico-químicas e biológicas devem ser cuidadosamente observadas. As propriedades físico-químicas da matriz incluem a área de superfície, porosidade, acidificação local, formulação química do material (natural *versus* sintético), arquitetura, integridade mecânica, cinética de degradação e potencial para liberação de fármacos. Já as propriedades biológicas compreendem sua capacidade

de promover adesão, proliferação e diferenciação celulares, além de permitir a deposição de MEC e angiogênese (Li et al., 2010; Ng et al., 2005; Cancedda et al., 2003).

A matriz suporte ideal deve ser capaz de manter as funções das células características do tecido alvo. Para isso, deve possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação. Ademais, não devem desenvolver toxicidade tóxica ou sistêmica, ter propriedades para promover ou inibir interação célula-matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação, ser um material de fácil produção ou aquisição e purificação e possuir compatibilidade com substâncias químicas e soluções aquosas em condições fisiológicas (Bhatia, 2010; Li et al., 2010; Tabata, 2009; Bacakova, 2004; Cancedda et al., 2003; Holmes, 2002).

Uma das principais características da matriz é sua capacidade de ser colonizada por células. Na engenharia de tecidos, a adesão das células à matriz é importante, não só para a sua proliferação, como para a imobilização das células dentro do material, garantindo assim, a permanência das células no local da lesão após o implante. A introdução de células no organismo pode ser efetuada através de matrizes injetáveis, matrizes flexíveis, rígidas ou macroencapsulação. Em matrizes injetáveis, as células são misturadas com soluções de polímeros que gelificam após o implante. (Rustad et al., 2010; Tabata, 2009; Ng et al., 2005; Cancedda et al., 2003).

A biodegradação é outro fator importante na escolha do biomaterial. Essa propriedade se refere à susceptibilidade de um polímero ser degradado por hidrólise ou digestão enzimática para que possa ser substituída pela matriz natural sintetizada pelas células do tecido. Os produtos da degradação não devem provocar inflamação ou citotoxicidade e devem ser removidos através de vias metabólicas (Ge et al., 2008).

As estruturas porosas 3D são usadas como modelos para a semeadura celular temporária, migração, proliferação e diferenciação antes da regeneração do tecido biologicamente funcional ou da matriz extracelular natural (Hutmacher, 2000). Nesse cenário, a matriz tridimensional (3D) visa imitar o microambiente tecidual, facilitando a regeneração do tecido comprometido tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dessa forma, esses microambientes 3D devem oferecer uma configuração e composição similares ao tecido nativo a fim de promover e facilitar a diferenciação celular e a manutenção do fenótipo diferenciado, além de permitir a síntese de MEC (Bonfield, 2006).

Variáveis relacionadas ao *design* da matriz tridimensional também influenciam fortemente a resposta biológica. Os parâmetros arquitetônicos, tais como porosidade,

tamanho dos poros e interconectividade, são relatada como um dos fatores determinantes na indução do crescimento celular (Wu & Ding, 2004; Rose e Oreffo, 2002). Mikos propôs, na década de 90, que a taxa de penetração e crescimento celular em suportes porosos está diretamente relacionada ao tamanho e distribuição dos poros no material. Através de uma superfície adequada o material promove a adesão celular, enquanto a existência de poros interconectados permite a migração e o crescimento das células no interior da matriz, ao mesmo tempo em que possibilita a conexão célula-célula. Além disso, a presença de poros interconectados melhora a difusão dos metabólitos e produtos secretados pelas células (Mok et al., 2003; Desai, 2000) Uma adequada microporosidade é essencial para o crescimento de capilares (Salgado et al., 2004). Aproximadamente 80% de porosidade é o ponto de equilíbrio entre propriedades mecânicas e interconectividade ideais (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

A maioria dos biomateriais são alternativas efetivas para a substituição de tecidos, pois não apresentam risco de transmissão de doenças e nem estimulam a rejeição imunológica, além de possivelmente serem disponíveis na natureza. O uso de biomateriais como arcabouços para o transplante de células-tronco mesenquimais têm mostrado um grande potencial para aplicações terapêuticas na ortopedia (Pirracò et al., 2011; Seong et al., 2010). Para a engenharia de tecido ósseo, as matrizes devem ainda ser osteocondutoras e osteoindutoras, no que se refere à capacidade do enxerto conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (Sicca et al., 2000). Este biomaterial deve ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído pelo tecido ósseo neoformado. A osteoindução é a capacidade de o enxerto induzir a diferenciação de células-tronco mesenquimais do leito receptor em osteoblastos que promovam a formação de novo osso. Este mecanismo está relacionado à atividade da BMP, presente na matriz óssea (Ueda, 2003). E por fim, a osteointegração, que é a capacidade do material substituto de se unir quimicamente sem que haja tecido fibroso interposto. O enxerto é considerado osteogênico quando células ósseas vivas do próprio enxerto permanecem com capacidade de formação de novo tecido ósseo no leito receptor.

De acordo com sua composição, os biomateriais podem ser classificados em inorgânicos (cerâmicas, metais, polímeros sintéticos); orgânicos (colágeno, quitosana, queratina, amido, polissacarídeo e tecidos naturais); e compósitos (compostos por mais de um tipo de material) (Lichte et al., 2011; Cheung et al., 2007 ; Caplan, 2001).



Os biomateriais inorgânicos compreendem (i) os metais, que apesar de serem biocompatíveis, moldáveis, e apresentarem alta resistência, não são biodegradáveis (Lichte et al., 2011); e (ii) as cerâmicas, que são biocompatíveis, osteoindutoras e osteocondutoras, no entanto apresentam baixa estabilidade mecânica, são quebradiças e sua biodegradabilidade é difícil de ser prevista comprometendo a estabilidade da matriz (Salgado et al., 2004). Matrizes exclusivamente inorgânicas tais como hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP ( $\beta$ - fosfato tricálcio) associados à MSC autólogas foram usadas com sucesso (Bruder et al., 1998) para tratar defeitos ósseos de grande tamanho que não foram curados pelas células residentes ou pela inserção do dispositivo isolado. A hidroxiapatita (HA), o fosfato tri cálcio (TCP) e os biovidros (Tabata, 2009; Lemos and Ferreira, 2004; Valério et al., 2005), são materiais cerâmicos bioativos amplamente investigados e utilizados como substitutos ósseos densos ou porosos. Embora estes materiais possuam uma boa biocompatibilidade e elevado potencial osteocondutor quando utilizados sob formas porosas, são de difícil modelagem e manutenção no local de implantação (Lemos & Ferreira, 2004).

Os biomateriais orgânicos compreendem os polímeros, que têm recebido destaque devido à sua vasta aplicabilidade no corpo humano (Blunk, 2003). Um dos fatores que tem atraído a atenção para a utilização de polímeros é a possibilidade de alterar grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias, o que pode auxiliar na fabricação de materiais que induzam interações específicas entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (Oréfice, 2005).

Os polímeros atualmente utilizados na construção da matriz podem ser sintéticos, ou naturais. Apesar de exibirem boas propriedades mecânicas, polímeros sintéticos apresentam desvantagens do ponto de vista biológico. Podem promover reação do tipo corpo estranho, infecção, extrusão, ruptura e contratura capsular (Hart, 2003; Wyatt, 2003; Mass et al., 1997). A grande maioria dos polímeros sintéticos biodegradáveis são poliésteres. Dentre eles, os mais usados em aplicações clínicas são o ácido poliglicólico e o ácido polilático (Athanasίου et al., 1996). Entretanto, a degradação desses polímeros resulta o ácido glicólico que, em altas concentrações, pode resultar em dano tecidual pelo elevado grau de acidez (Mayer & Hollinger, 1995; Taylor et al., 1994). Além disso, foi demonstrado que a liberação de pequenas partículas desses materiais iniciava reações inflamatórias (Gibbons, 1992). Já o PMMA (poli metil meta acrilato), outro polímero sintético muito usado, inibe a diferenciação de células osteoprogenitoras da medula óssea (Chiu et al, 2006). Outros polímeros sintéticos

também foram propostos para o uso na engenharia de tecidos, sendo eles: polietileno, polipropileno, poliuretano, poliamidas, poliacetato, policarbonato, politetrafluoroetileno, dentre outros (Ma et al., 2009; Liu & Ma, 2004; Mano et al., 2004; Wang, 2003; Seal et al., 2001). Entretanto, foi demonstrado que a liberação de pequenas partículas da maioria desses materiais iniciava reações inflamatórias (Ma et al., 2009; Gibbons, 1992). Além disso, polímeros sintéticos tem baixa eficiência na adesão celular e apresentam pobre retenção da MEC neoformada (Tortelli & Cancedda, 2009).

Atualmente, polímeros naturais e biomiméticos têm se destacado como matrizes para regeneração tecidual por apresentarem resposta biológica superior quando comparados aos biomateriais sintéticos (Li et al., 2010; Thein-Han, 2009; Donati et al., 2004). Os polímeros naturais vêm sendo amplamente utilizados na construção de matrizes porosas aplicadas à engenharia de tecidos, incluindo a de ossos e outros tecidos mineralizados (Hutmacher, 2000).

Dentro desse contexto, uma opção para o desenvolvimento das matrizes é o emprego de componentes da matriz extracelular derivados de fontes animais (Lawrence e Madhally, 2008). Têm sido desenvolvidos biomateriais que sirvam como suporte físico e atuem como um substrato adesivo para células durante cultura “*in vitro*” para subsequente implantação. Esses biomateriais devem viabilizar a regeneração do tecido hospedeiro em termos de morfologia e função (Grenha et al., 2010).

Em meio aos principais polímeros naturais utilizados na engenharia de tecidos destacam-se os polissacarídeos (Li et al., 2010; Suh et al., 2000). Dentre estes, a quitosana atende às necessidades básicas para a escolha do polímero constituinte da matriz, apresentando características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, biodisponibilidade, além de apresentar um baixo custo facilitando o acesso da população (Li et al., 2010; Di Martino et al., 2005).

Esse polissacarídeo derivado da quitina, principal molécula estrutural do exoesqueleto de crustáceos, é parcialmente deacetilado e tem baixo peso molecular. Dependendo da fonte e dos procedimentos de preparação seu peso molecular pode variar de 300 a 1000 kD com grau de deacetilação de 30% a 95% (Li et al., 2010; Di Martino, et al., 2005; Donati et al., 2004). Estruturalmente, a quitosana é um polissacarídeo linear consistindo de resíduos de D-glicosaminas com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), com numerosas ligações randômicas de N-acetil-glicosamina (Breyner et al., 2010; Li et al., 2010; Di Martino et al., 2005, Donati et al., 2004) (Figura 6).

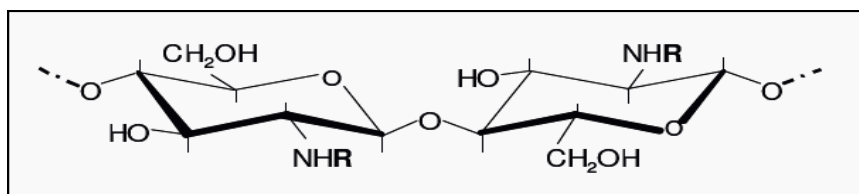
A quitosana é um polímero semi-cristalino, sendo seu grau de cristalinidade conferida pelo grau de deacetilação. É normalmente insolúvel em solução aquosa com pH em torno de 7 (Li et al., 2010; Donati et al., 2004). No entanto, em diluentes ácidos, os grupos de carbonilas livres são protonados e a molécula se torna solúvel. Devido a sua natureza catiônica, esse polímero é o principal responsável por interações eletrostáticas com os glicosaminoglicanos aniônicos, proteoglicanos e outras moléculas carregadas negativamente, sendo responsável pela adesão celular (Midihally et al., 1999).

A sua capacidade adesiva é atribuída ao pKa aproximado de 6.5, em pH ácido, tornando-se um polieletrólito com elevada densidade de carga positiva por resíduo de glucosamina, e como tal, interagindo com moléculas carregadas negativamente, principalmente proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e as membranas mucosas (Li et al., 2010; Donati et al., 2004).

Esse polímero tem sido largamente aplicado em áreas farmacêuticas e biomédicas, devido às suas características físicoquímicas e biológicas (Kofugi et al., 2005). Dentre elas podemos citar biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, propriedades de adsorção de fármacos, capacidade de formar membranas, bioadesividade, atividade fungicida e bactericida, e o seu poder hemostático (Miranda et al., 2011; Li et al., 2010; Breyner et al., 2009; Di Martino et al., 2005; Huang et al., 2005; Kofugi et al., 2005). Sua atividade antimicrobiana que está relacionada à interação entre o grupo carregado positivamente da quitosana com o grupo carregado negativamente da membrana celular do microrganismo (Di Martino et al., 2005; Huang et al., 2005)

Devido a sua alta biocompatibilidade, aceitável biodegradabilidade, similaridade química com a estrutura da matriz extracelular, atividade antimicrobiana e capacidade para produzir matrizes porosas, a quitosana tem sido amplamente estudada como um biomaterial para aplicação em engenharia de tecidos (Khor & Lim, 2003; Huang et al., 2005; Wang et al., 2003; Ma et al., 2003; 24. Xia et al., 2004). Suh e Matthew, 2000, além de reportarem a biocompatibilidade e a biodegradação da quitosana na presença de lisozima, mostraram que os seus produtos de degradação não são tóxicos e podem ser incorporados na MEC para a reconstrução normal dos tecidos (Suh e Matthew, 2000). Essas propriedades, conjuntamente com a habilidade em promover crescimento e diferenciação de células ósseas, estimulam o uso da quitosana como um material de suporte para a regeneração óssea (Miranda et al., 2011; Machado et al., 2007).

Atualmente tem sido demonstrado que este tipo de polímero possui potencialidades para ser aplicado em matrizes para o transplante de células e regeneração de diversos tecidos como ósseo (Miranda et al., 2011; Spin-Neto et al., 2008; Machado et al., 2007) e cartilaginoso (Breyner et al., 2009)



**Figura 6:** Estrutura química da quitosana. Glicosamina (R=H) é a unidade de repetição predominante. A unidade de repetição acetilada, *N*-acetilglicosamina (R=COCH<sub>3</sub>) está distribuída aleatoriamente. Adaptado de Coutinho (2008).

É sabido que quando um tecido ou um órgão é acometido por degeneração e apresenta deficiência na regeneração há a formação de uma cicatriz, comprometendo ainda mais seriamente a função desse tecido. Além disso, a lesão pode progredir levando a degeneração tecidual. Com a finalidade de substituir o tecido lesado são necessárias matrizes 3D semelhantes à MEC do tecido nativo. Essa semelhança favorece a interação adequada das células com a matriz 3D, o recrutamento de células “chaves” para o local da lesão e a comunicação intercelular, permitindo a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Bonfield, 2006; Hwang, 2006). A fim de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas da matriz e mimetizar a MEC óssea, a quitosana tem sido combinada com uma variedade de materiais como alginato, hidroxiapatita, ácido hialurônico, fosfato de cálcio e fatores de crescimento para potencial aplicação em ortopedia (Li et al., 2010; Di Martino et al., 2004).

Dentre os vários materiais, o colágeno ou gelatina tem sido explorado por induzir uma alta taxa de proliferação e síntese de MEC do tecido ósseo (Miranda et al., 2011; Sun et al., 2009; Huang et al., 2005; Risbud et al., 2001). A associação de quitosana e colágeno no processamento das matrizes é um método efetivo de se modificar a taxa de biodegradação e melhorar as propriedades mecânicas desse polímero (Sun et al., 2009). A adição de gelatina ao biomaterial a base de quitosana tem demonstrado resultados promissores (Miranda et al., 2011; Li et al., 2010; Breyner et al., 2009; Di Martino et al., 2004; Rocha et al., 2002).

Estudos demonstram que a gelatina exibe características importantes para a engenharia de tecidos como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e alta resistência à tensão (Li et al., 2010; Huang et al., 2005; Rocha et al., 2002).

A gelatina é uma proteína solúvel derivada do colágeno parcialmente hidrolizado (Han et al., 2009). O colágeno tipo I, presente em gelatina de origem animal, desempenha um papel central na cascata temporal dos eventos que conduzem à formação de osso novo a partir de células progenitoras (Yang et al., 2004). As proteínas de adesão, como o colágeno e seus receptores, constituem um sistema de reconhecimento versátil que fornece sinais de ancoragem, tração para a migração e polarização, posição e diferenciação celular (Huang et al., 2005; Wang et al., 2003; Lawrence e Madhally, 2008). O colágeno apresenta seqüências de aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD - seqüência) envolvidas com a adesão celular promovendo ancoragem, tração para a migração e proliferação celular (Li et al., 2010; Breyner et al., 2009; Huang et al., 2005; Yang et al., 2004; Le Trong, 2003). Na engenharia óssea a adesão celular é uma questão fundamental, pois representa um pré-requisito para a secreção da matriz por osteoblastos, células dependentes de ancoragem (Silva et al., 2008; Valerio et al., 2005). Recentemente, foi relatado que a mistura de gelatina com quitosana proporciona uma armação estrutural melhor para a proliferação e viabilidade celular em relação à quitosana pura (Thein-Han et al., 2009; Sun et al., 2009). Quando a quitosana e a gelatina são colocadas juntas, a estrutura formada pode afetar a distribuição espacial de ligantes de integrina e a interação dos policatiônicos da quitosana com a superfície aniônica da célula, influenciando na adesão e bioatividade celular, no processo de remodelamento do tecido e na qualidade da regeneração tecidual (Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010; Huang et al., 2005).

A matriz 3D pode ser manipulada ou montada de acordo com a necessidade tecidual. A fim de mimetizar o microambiente ósseo, a condroitina surge como outro composto ideal à formação da matriz. A condroitina é a principal glicosaminoglicana do osso e, em associação com as fibras de colágeno, promove a mineralização *in vitro* (Bouvier et al., 1996). Estudos demonstraram que a condroitina não só aumenta a proliferação das células em contato com a zona de mineralização (Moreira et al., 2004), como também estimula a produção de fosfatase alcalina pelas mesmas (Li et al., 2010; Wollenweber et al., 2006).

A maioria dos polímeros naturais usados na engenharia de tecidos são rapidamente degradados e facilmente reabsorvidos *in vivo*, tornando necessária a adição de agentes reticulantes a fim de prolongar a permanência do implante e melhorar suas propriedades mecânicas (Li et al., 2010; Huang et al., 2005; Yang et al., 2004). A reticulação origina a formação de novas estruturas moleculares e, dependendo das propriedades de degradação pretendidas, são utilizados diferentes processos físicos ou químicos de reticulação. Os processos físicos incluem secagem, aquecimento ou exposição à radiação gama ou ultravioleta. Nos processos químicos de reticulação, são usados agentes ligantes ou reticulantes que promovam a ligação entre grupos funcionais dos aminoácidos (Li et al., 2010; Huang et al., 2005). Os agentes reticulantes mais comuns são o formaldeído, o glutaraldeído, o ácido tânico e carbodiimidas. Entretanto, o glutaraldeído, introduzido por Carpentier, no final dos anos 60, continua sendo o mais largamente empregado. Este reticulante proporciona modificações químicas ao grupo amino da quitosana conferindo melhorias quanto ao tamanho do poro, resistência mecânica, estabilidade química, hidrofiliabilidade e ainda propriedades de adsorção/dessorção modificadas (Li et al., 2010; Huang et al., 2005).

### 3 JUSTIFICATIVA

Perdas e danos no tecido ósseo constituem grave problema de saúde pública (Peggy et al., 2011). Milhões de brasileiros sofrem, atualmente, com problemas relacionados a lesões deste tecido. Dentre as principais causas da perda deste tecido estão doenças como osteoporose e osteogênese imperfeita, além de violência urbana e acidentes automobilísticos e domésticos (Peggy, 2011; Ikada, 2006; Espinoza et al, 2004; Gawryszewski et al., 2004; Huang et al., 2002).

Uma vez que a qualidade de vida das pessoas que sofrem fraturas pode ser severamente reduzida, um impacto econômico e social tem impulsionado o desenvolvimento de novos tratamentos que acelerem a cura das fraturas (Peggy, 2011; Tabata, 2009; Vacanti & Vacanti, 2000).

Os enxertos são amplamente utilizados na intenção de promover o reparo ósseo, entretanto apresentam como desvantagem o potencial de desencadear reações imunogênicas e alergênicas (Miranda et al., 2011; Tabata, 2009; Rosa et al., 2008; Hui et al., 2005). Já enxertos de tecido autólogo, embora tenham propriedades biológicas ideais na maioria dos casos, podem implicar em seqüela estética e/ou funcional da área doadora (Tabata, 2009; Bauer et al., 2000; Bostwick, 1994). Além disso, é difícil a obtenção de quantidades suficientes de tecido para enxerto na maioria dos pacientes (Miranda et al., 2011; Tabata, 2009; Hui et al., 2005).

O advento da biologia molecular e celular trouxe importantes conhecimentos sobre o processo de diferenciação celular, interação entre diferentes tipos celulares, a conexão entre estas e a matriz extracelular e a atuação de fatores bioativos. Estas conquistas permitiram o advento da Engenharia de Tecidos, se tornando possível vislumbrarem novas áreas de investigação e pesquisa para reparo de tecidos e órgãos (Miranda et al., 2011; Bhatia, 2010; Li et al., 2010; Ikada, 2009; Tabata, 2009; Tabata, 2008; Arosarena, 2005; Hui et al., 2005; Chen et al., 2004; Langer & Vacanti, 1999).

Os biomateriais vêm conquistando espaço no campo da regeneração óssea (Pirracó et al., 2011; Li et al, 2010). Na engenharia de tecidos, a adesão das células à matriz é importante, não só para a sua proliferação, mas também para a imobilização das células dentro do material, garantindo assim, a permanência das células no local da lesão após o implante (Pirracó et al., 2011; Li et al., 2010, Ng et al., 2005).

A matriz suporte ideal deve ser capaz de manter as funções das células características do tecido alvo. Além disso, deve ser biocompatível, não imunogênica, atóxica, biodegradável, para que possa ser substituída pela matriz natural feita pelas células do tecido, de fácil fabricação e baixo custo (Bhatia, 2010; Li et al., 2010; Rustad et al., 2010; Tabata, 2009; Cancedda et al., 2003).

Apesar de exibirem boas propriedades mecânicas, polímeros sintéticos podem promover reação do tipo corpo estranho, infecção extrusão, ruptura e contratura capsular (Rustad et al., 2010; Hart, 2003; Wyatt, 2003). Assim, os pesquisadores têm focado seus estudos na utilização de biomateriais naturais.

A quitosana, em associação à gelatina e condrotina, atende às necessidades básicas para a escolha do polímero constituinte da matriz (Li et al., 2010; Machado et al., 2007; Di Martino et al., 2005).

O uso de biomateriais associados às células, além de facilitar a inserção e recolocação das mesmas no organismo, é uma ferramenta ideal para promover a estabilização precoce da lesão (Tabata, 2009; Tabata, 2008; Bagby et al., 2004) Por este motivo, a engenharia de tecidos surge como uma alternativa à injeção de uma suspensão de células ou fatores de crescimento para a regeneração de lesões (Tabata, 2009; Tabata, 2008; Bagby et al., 2004; Francis Suh et al., 2000).

Devido à sua alta taxa de proliferação e potencial multilinhagem, células tronco são candidatos ideais para a engenharia de tecidos (Li et al., 2010; Yarak & Okamoto, 2010; Cancedda et al., 2003). Por sua fácil obtenção, alta quantidade celular e baixa morbidade tecidual, o tecido adiposo surge como fonte alternativa à extração de MSC de medula óssea (Li et al., 2010; Yarak & Okamoto, 2010; Hui et al., 2005; Hattori et al., 2004; Zuk et al., 2001).

A utilização de biomateriais como arcabouços para o transplante de células tronco têm mostrado um grande potencial para aplicações terapêuticas na ortopedia (Pirraco et al., 2011; Li et al, 2010). Técnicas de Engenharia de Tecido têm sido indicadas em tratamentos de lesões em tecido ósseo, por ser uma das mais promissoras terapias alternativas para reparo de danos ósseos (Pirraco et al., 2011; Li et al, 2010).

Diante do exposto, seria extremamente vantajoso isolar células tronco do paciente, induzir a osteogênese destas células em uma matriz *in vitro* e novamente transplantá-las no doador (Hui et al., 2005).



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Desenvolver matrizes orgânicas 3D porosas a base de quitosana, gelatina e sulfato de condroitina, capazes de promover respostas biológicas (*in vitro*) e funcionais (*in vivo*), visando o cultivo e a osteogênese de células-tronco derivadas de tecido adiposo para potencial aplicação na Engenharia de Tecido Ósseo.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1- Construir matriz tridimensional à base de quitosana, gelatina e sulfato de condroitina para aplicação em engenharia tecidual.
- 2- Extrair, estabelecer e caracterizar culturas bi e tridimensionais de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de ratos.
- 3- Comparar o potencial osteogênico de células-tronco derivadas do tecido adiposo quando cultivadas em monocamada (2D) e matriz orgânica 3D porosa.
- 4- Avaliar a porosidade, citotoxicidade e biocompatibilidade das matrizes 3D através de MEV, ensaios *in vitro* e implantes *in vivo* subcutâneos e após defeitos críticos em calvária de ratos.

## 5 METODOLOGIA

Este trabalho de pesquisa compreende dois estudos principais. O primeiro corresponde à preparação, caracterização e avaliação, *in vitro*, da biocompatibilidade e degradação de uma matriz tridimensional, porosa a base de quitosana, gelatina e condroitina e indução da osteogênese de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo em sistema 3D. O segundo estudo baseia-se na avaliação com comportamento da matriz 3D *in vivo* através de implantes subcutâneos e em lesões de calvária de ratos.

### 5.1 Preparação dos meios de cultura celular

#### 5.1.1 Meio controle

O meio controle (MC) foi preparado utilizando-se D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), suplementado com soro fetal bovino (SFB, *Serum Fetal Bovine*) a 10% (Gibco). O sistema complemento presente no SFB foi previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 56°C, durante 30 minutos. Ainda foram acrescentados ao meio os antibióticos gentamicina (50 g/L), penicilina (500U/mL) e estreptomicina (500mg/mL) (PSA, Gibco), além de 2 gramas de bicarbonato de sódio (Merck). Após a preparação do meio o pH foi ajustado para 7,2. Posteriormente o meio foi submetido à filtração utilizando-se membrana de 0,22 µm (Millipore). Este procedimento se deu em ambiente estéril (capela de fluxo laminar).

#### 5.1.2 Meio de indução osteogênica

O meio de indução osteogênica (MO) foi obtido acrescentando-se 0,2 µM de ácido ascórbico (Sigma), 10 µM de β-glicerofosfato (Sigma) e 10<sup>-8</sup> M de dexametasona (Sigma), ao meio controle suplementado com SFB (Gomide et al., 2012; Miranda et al., 2011; Sugiura et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Huang et al., 2002; Zuk et al., 2001).

## 5.2 Animais

Ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, transgênicos para EGFP (*Enhanced Green fluorescent protein*) fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, foram obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

## 5.3 Preparações das matrizes tridimensional (biomaterial)

Inicialmente foram preparadas três soluções dos componentes da matriz 3D. Quitosana 0,7%, gelatina 0,7% e sulfato de condroitina 0,1% foram diluídos em 50 mL de ácido acético 1 M, cada até que as soluções adquirissem consistência de gel. Em seguida, essas soluções foram misturadas na proporção de 3/1/0,5 de quitosana, gelatina e sulfato de condroitina, respectivamente e deixadas sob agitação por 2 horas. Após este período, o ligante glutaraldeído foi acrescentado à mistura na concentração de 0,1%. A solução ficou sob agitação por mais 5 minutos, sendo então distribuída na proporção de 1.0 mL por poço em uma placa de cultura de 48 poços (TPP). A placa ficou à -20° C por 24 horas sendo, posteriormente, submetida à liofilização *overnight*. Decorridos este período, os discos foram lavados com álcool absoluto e deixados à secagem em temperatura ambiente. Cada placa foi embalada de modo hermético e esterilizada por radiação gamma de uma fonte de Co<sup>60</sup> a 15 KGrays no CDTN/CNEN (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear/ Centro Nacional de Energia Nuclear).

## 5.4 Extração das células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC)

A obtenção das células-tronco mesenquimais a partir do tecido adiposo seguiu o protocolo descrito por Ogawa et al. (2004), com adaptações. Os animais foram eutanasiados com aplicação de Ketamina 40 mg/Kg, via intramuscular e banhados com álcool 70% para evitar contaminação. Posteriormente, o peritônio dos animais foi exposto e a gordura inguinal retirada e colocada em tubo de 50 mL contendo meio D-MEM. Na câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, o tecido foi disperso com Salina Tamponada (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) até eliminação do conteúdo sanguíneo visível. Após, o tecido obtido foi lavado com D-MEM por três vezes. A

gordura foi extensivamente cortada, macerada e submetida à digestão enzimática em solução contendo PBS com 0,15% de colagenase tipo D (Gibco), por 2 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A cada 15 minutos esta preparação foi vigorosamente agitada. Decorrido o período de duas horas, a digestão foi interrompida pela adição de D-MEM acrescido de 10% de SFB em volume igual ao contido na preparação. A suspensão de células foi centrifugada a 1400 rpm, por 10 minutos, a 10°C. Ao final da centrifugação o sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado, e o precipitado contendo a fração estroma vascular foi ressuspensionado em meio controle.

### **5.5 Cultura e expansão de células-tronco mesenquimais**

As células obtidas do tecido adiposo foram semeadas em frasco de cultura celular T-75 (75 cm<sup>3</sup>, TPP) contendo 10 mL de meio D-MEM suplementado com 10% de SFB (MC) e cultivadas em uma estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por quatro passagens. Nos dois dias subsequentes à extração, cada frasco foi lavado, várias vezes, com PBS para remoção de hemácias e outras células não aderentes. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Uma vez estabelecida a cultura celular, esta foi monitorada diariamente observando-se o aspecto morfológico da cultura e coloração do meio, com o auxílio de microscopia óptica. Ao atingirem uma confluência de 90-95%, as células foram removidas por tripsinização. Para isso, duas lavagens com PBS 0,15M foram feitas. Posteriormente acrescentou-se às culturas 2mL de tripsina/EDTA (etilenodiaminotetraacético) (Gibco) a 1% sendo as garrafas com as culturas incubadas por 10 minutos em estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, até que as células se soltassem completamente. Ao final deste processo, a ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 8 mL de meio D-MEM suplementado com SFB. Numa próxima etapa, estas células foram novamente plaqueadas obedecendo a razão de 1 garrafa inicial para 3 garrafas finais.

Ao atingirem a quarta passagem, as culturas foram novamente submetidas à ação da tripsina. As células foram então contadas sob microscópio de luz invertido com auxílio de Câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram semeadas em placas de 24 poços (Nunc) à razão de 1 X 10<sup>6</sup> células/mL/poço em cultura de monocamada (cultura 2D) e em placas de 48 poços (Nunc) à razão de 1 X 10<sup>6</sup> células/mL/poço em

cultura tridimensional (3D). As células cultivadas em monocamada, na ausência de biomaterial, foram usadas como controle positivo. Finalmente, procedeu-se à cultura das células em meio osteogênico por até seis semanas, sendo este trocado a cada três dias, aproximadamente, podendo variar de acordo com a observação da coloração apresentada pelo meio de cultivo. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e analisadas ao final de 1, 2, e 3 semanas. Três experimentos independentes foram realizados e cada variável foi avaliada em triplicata.

## **5.6 Caracterizações das matrizes 3D a base de quitosana, gelatina e condroitina**

As matrizes 3D foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), teste de degradação e ensaio de resistência à compressão.

### **5.6.1 Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise micro estrutural da matriz 3D e das células aderidas à sua superfície utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. Após colonização das células no biomaterial, em placas de 24 poços, esta foi mantida em cultivo com meios de cultura controle por 72 horas em estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida foi feito o preparo das amostras para análise por MEV. A primeira etapa do processamento consiste no processo de fixação das células. Cada poço contendo a matriz 3D colonizada e não colonizada por ADSC teve o meio de cultura removido e lavado três vezes com PBS à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de sódio 0,1M por um período de 2 horas à temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados com tampão Cacodilato de Sódio 0,1M por duas vezes. Em seguida, foi adicionado Tetróxido de Ósmio a 1% por 2 horas à 4°C, sempre protegidos da luz. Ao término deste período, os poços foram lavados 5 vezes com água destilada. Terminado o processo de fixação iniciou-se o processo de desidratação através de imersão em álcool etílico em diferentes concentrações (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) por 15 minutos cada, e álcool absoluto por 1 hora. Em seguida, os espécimes permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>. A secagem em ponto crítico é o processo pelo qual o álcool é substituído pelo CO<sub>2</sub>, evitando dano à célula causado pela tensão superficial durante o processo da evaporação natural. O material foi seco no aparelho de ponto crítico de

Balzers, modelo CPD-020 do CEMEL-UFMG (Centro de Microscopia Eletrônica). As amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão e submetidas ao processo de metalização em ouro.

A metalização e a obtenção das imagens foram realizadas no serviço de microscopia eletrônica do Departamento de Metalurgia, DEMET, da Escola de Engenharia e do Centro de Microscopia Eletrônica, CEMEL, do Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. As micrografias foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura/JEOL/JSM- 6360LV, do DEMET-UFMG. A Voltagem utilizada foi de 15KV.

### **5.6.2 Ensaio reológico**

Reologia é a ciência que estuda a deformação e a fluidez dos materiais. Experimentos reológicos não revelam apenas informações sobre o comportamento fluido dos líquidos, mas também o comportamento da deformação dos sólidos. Grandes deformações produzidas pela tensão de cisalhamento obrigam os materiais a fluir. A maioria dos materiais são viscoelásticos, exibem um comportamento viscoso e elástico simultaneamente. No comportamento elástico quando a força aplicada é removida, a energia de deformação armazenada no corpo se torna disponível para agir como uma força direcionadora no processo de recuperação. No comportamento viscoso, a energia de deformação é absorvida pelo corpo afetando sua estrutura ou dissipada como calor, ambos os processos levam a uma deformação irreversível.

Nesse estudo, as propriedades mecânicas da matriz 3D gelatina foram determinadas utilizando uma “Instron máquina de ensaios universal” (Instron 4505, EUA). Para medir a viscosidade das amostras os testes foram realizados sob carregamento de compressão utilizando uma cruzeta com velocidade de 2mm.min<sup>-1</sup>. Seis espécimes com 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura foram testados. Os resultados reportados são a média de seis amostras testadas.

## **5.7 Estudos *in vitro***

### **5.7.1 Caracterização de ADSC por citometria de fluxo**

ADSC de ratos da linhagem Lewis, transgênicos para a proteína EGFP foram cultivadas e expandidas *in vitro* e caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular (CD – *cluster of differentiation*), CD54, CD73, e CD90, que são marcadores de células-tronco mesenquimais. CD45, marcador de célula-tronco hematopoiética foi utilizado como controle negativo (Ucelli, 2006; Zuk, 2002). Esse ensaio foi realizado com células na 4<sup>a</sup> passagem, cultivadas em meio controle e submetidas a 30 dias de indução osteogênica.

#### **5.7.1.2 Marcação celular com anticorpos primários e secundários**

ADSC na concentração de  $1 \times 10^6$  foram incubadas durante 30 minutos a 4°C com 0,4 µg de anticorpos monoclonais de camundongo IgG1 anti CD54, CD45, CD73 e CD90 (Abcam). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 0,15M e incubadas com 0,4 µg do anticorpo secundário policlonal de cabra anti-IgG1 de camundongo marcado com FITC (Fluoresceína tiocianato – Calbichem), durante 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS 0,15M e fixadas em PBS 0,15M contendo 2% de formaldeído. Foram então analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD, San Jose, 46 CA, USA). Como controle negativo da reação, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade a fim de estabelecer a população a ser analisada.

#### **5.7.1.3 Leitura no FACScan**

Um mínimo de 20.000 eventos foi adquirido, utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para captura de fluorescência. Os dados foram analisados no programa WinMid 2.8. Inicialmente, a população de células estudadas foi delimitada através de regiões definidas no gráfico tamanho *versus* granulosidade gerado pela análise de células não marcadas, baseado nos dados obtidos por Zuk, 2001 e 2002. Posteriormente, foi utilizado um gráfico de histograma para delimitar a região do

controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. A partir da definição desses parâmetros, iniciou-se a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

### **5.7.2 Imunofluorescência em células-tronco mesenquimais**

ADSC de ratos da linhagem Lewis, transgênico para EGFP foram cultivadas sobre lamínulas de vidro numa concentração de  $1 \times 10^4$  células por lamínula. Essas células se encontravam na 4ª passagem e foram mantidas em meio controle por 48 horas ou submetidas à diferenciação osteogênica por 30 dias. Para realizar a imunofluorescência, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com PBS 0,15M, pH 7,2. Foram, então, fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos em geladeira. Após a fixação, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15M por duas vezes e permeabilizadas através da incubação com Triton X-100 a 0,25% (Roche) em PBS 0,15M por 10 minutos. Posteriormente, ocorreram 3 novos banhos com foram em PBS por 5 minutos cada. As células foram bloqueadas com 1% de BSA e 5% de soro de cabra diluídos em PBS 0,15M durante 2 horas a temperatura ambiente, a fim de evitar reação inespecífica com o anticorpo secundário de origem caprina. Por mais duas vezes as células foram lavadas com PBS 0,15M por 5 minutos cada. Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos anti-moléculas de superfície CD45, CD54, CD73 e CD90 (todos IgG1 camundongo anti-rato – BD Transduction Laboratories, USA) e anticorpo anti-GFP (Anticorpo policlonal de Coelho anti-rato – Abcam, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em solução de PBS 0,15M + 1% BSA, em uma concentração de 1:500. As lamínulas contendo as células tratadas foram incubadas com os anticorpos primários por 2 horas em câmara úmida à temperatura de 4°C. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15M 3 vezes por 5 minutos cada e em seguida, realizou-se a incubação com anticorpo secundário diluídos na mesma solução de diluição dos anticorpos primários (1:500).

Os anticorpos secundários (Molecular Probes) utilizados foram: anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 e anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 555. As lamínulas contendo células tratadas com anticorpos, primário e secundário, foram incubadas em câmara escura e úmida por 1 hora à temperatura ambiente. Após o período de incubação as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 0,15M por 5 minutos cada. Em



seguida, os núcleos dessas células fixadas sobre as lamínulas foram marcados com Hoescht (0,2µg/mL) durante 20 minutos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Para prevenir a perda de fluorescência e o ressecamento do material, lâminas receberam uma gota *Hydromount* (National Diagnostics, USA). As amostras foram mantidas sempre protegidas da luz e na geladeira até a análise no microscópio confocal Zeiss 510 Meta (CEMEL, UFMG). As células foram analisadas no microscópio confocal 510 Meta. Como controle negativo foi utilizado células incubadas apenas com o anticorpo secundário. As amostras foram excitadas a 488nm e observadas a 505-550 nm para detectar Alexa 488 e excitadas a 555, observadas a 585 para detectar Alexa 555 (Soliman, 2009).

### **5.7.3 Análise da osteogênese por RT-PCR**

O RNA total foi isolado de  $1 \times 10^6$  células usando o reagente de Trizol (Gibco). Células indiferenciadas e submetidas a até 21 dias de indução osteogênica, tanto em cultivo 2D quanto em cultivo 3D, foram utilizadas.

A reação (Trizol-células) foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, seguindo-se agitação vigorosa. Outra incubação foi realizada por 5 minutos à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada (13500 rpm, 15 minutos a 4°C), sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico gelado. A amostra foi incubada novamente por 10 minutos, à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada (13500 rpm, 15 minutos à 4°C). O sobrenadante foi retirado por inversão cuidadosa do tubo e o RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Após a centrifugação (11500 rpm, 5 minutos a 4°C) e descarte do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em 20µL de água tratada com dietilpirocarbonato.

Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 DNase Promega) a 37°C por 30 minutos em tampão apropriado. A seguir a reação foi interrompida pela adição de 20 nM de EGTA e a DNase foi inativada por 10 minutos a 65°C. A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm.

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *Superscript III RT* (Invitrogen, Life Technologies). O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de RNA total. A cada amostra foram adicionados 2,5

$\mu\text{M}$  de oligodT e 1 mM de dNTP. As amostras foram incubadas por 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ , seguidos por 1 minuto a  $4^{\circ}\text{C}$ . Adicionou-se: tampão apropriado para a reação de transcrição reversa contendo 10mM  $\text{MgCl}_2$  e 8mM DTT; 40U de RNAs *out* e 200U de transcriptase reversa (*Superscript III RT*). A reação ocorreu por 50 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ , seguindo-se 5 minutos a  $85^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as amostras foram tratadas com 2U RNase H de *E.coli* por 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , de acordo com o fabricante. O cDNA resultante foi utilizado nas reações de PCR descritas a seguir.

O cDNA sintetizado foi utilizado na reação de amplificação de osteopontina e osteocalcina. Como controle positivo da reação foi amplificado o cDNA de  $\beta$ -actina, proteína expressa constitutivamente por todos os tipos celulares. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio para a sua visualização. Os primers forward e reverse utilizados estão descritos na figura 7.

**Figura 7:** Tabela de iniciadores utilizados para amplificação dos segmentos gênicos: osteopontina, osteocalcina e  $\beta$ -actina

Primers	Foward	Reverse
Osteopontina	TCCCAGTTGCCAGCGTCTGA	GCTGGCTTTGGAAGCTCGCCTGA
Osteocalcina	AGCCTTCATGTCCAAGCAGGAG	TAAACGGTGGTGCCATAGATGC
$\beta$ -actina	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA

#### 5.7.4 Teste de viabilidade celular – MTT

Este ensaio, descrito por Mosmann (1983), baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, em converter o substrato dimetilthiazol (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide - MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan obtida com a reação é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Inicialmente as culturas tiveram seu meio totalmente retirado, e acrescentou-se a cada poço 210  $\mu\text{L}$  de meio osteogênico e 170  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (Sigma) na concentração de 5 mg/mL. As placas foram então incubadas em estufa 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Ao final deste período, foram realizadas observações ao microscópio

óptico para a verificação da presença de cristais de formazan. Posteriormente, foi acrescido 210 µL de SDS/HCl 10% (Gibco) por poço e as placas foram novamente incubadas nas mesmas condições por 12 horas, para a completa dissolução dos cristais. Decorrido este período, foram aliqüotados 100 µL da preparação contida em cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços. Só então o ensaio pôde ser quantificado através da leitura dos valores de absorbância por leitor de Elisa (Elx800, Bio-Tek, Instruments Inc.) em um comprimento de onda de 595 nm. O branco (apenas o meio de cultivo e os reagentes da reação, sem amostra) da reação foi constituído por uma solução de 170 µL de MTT, 210 µL de meio osteogênico e 210 µL de SDS/HCl 10% para culturas de monocamada e de 170µL de MTT, 210µL de meio osteogênico e 210µL de SDS/HCl 10% incubados em biomaterial para culturas 3D. Ambos foram decrescidos do resultado da leitura.

O ensaio com MTT constitui-se num método colorimétrico sensível e quantitativo que visa mensurar a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio foi realizado nos tempos zero (controle), 1, 2 e 3 semanas após a indução osteogênica, tanto em culturas 2D quanto 3D. Três experimentos independentes foram realizados e cada variável foi avaliada em triplicata.

### **5.7.5 Ensaio da atividade da Fosfatase Alcalina**

A produção da fosfatase alcalina (FA) foi avaliada pelo ensaio da redução do NBT-BCIP (Gibco). Esse ensaio é baseado em uma reação cromógena, iniciada pela clivagem do grupo fosfato da molécula de BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina) pela fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazolio clorídrico) a um precipitado insolúvel de cor púrpura (Meltzer et al., 1997).

Foram retirados das culturas 300 µL de sobrenadante e acrescidos a ele 100µL da solução de NBT/BCIP, previamente preparada. Em seguida a placa foi incubada por 2 horas em estufa com atmosfera de 5%CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao final do período de incubação, foram recolhidos 100 µL da preparação contida em cada poço e estes foram transferidos para uma placa de 96 poços. Os valores de absorbância da solução foram realizados por leitor de Elisa utilizando-se comprimento de onda de 595 nm. O branco foi constituído de 100 µL da solução de NBT/BCIP para culturas de monocamada e de 100 µL da

solução de NBT/BCIP incubado em biomaterial sem célula para culturas 3D. Ambos foram decrescidos do resultado da leitura (Zonari et al., 2012).

Este ensaio foi executado com o objetivo de certificar o processo osteogênico, visto que a fosfatase alcalina funciona como marcador positivo tanto de MSC quanto evidencia o processo osteogênico. A realização deste procedimento se deu nos tempos, zero (controle), 1, 2 e 3 semanas tanto em cultura de monocamada quanto tridimensional.

### **5.7.6 Ensaio de dosagem de colágeno total**

A dosagem do colágeno foi realizada através de marcação com o *Sirius Red* utilizando o *Kit SIRCOL Collagen Assay* (Biocolor) (Breyner et al., 2010; Valerio et al., 2004). O corante (*Sirius Red*), presente no *Kit*, é aniônico, com grupos de cadeias laterais de ácido sulfônico, que reagem com grupos de cadeias laterais dos aminoácidos presentes no colágeno. Esse corante tem a propriedade de se ligar seletivamente à seqüência terminal do colágeno de mamíferos, composta por tripeptídeos [Gli-X-Y]. Esse experimento não diferencia os tipos de colágeno entre si.

Para a realização deste ensaio, foram utilizado 50 µL de sobrenadante previamente aliquotados e armazenados em tubos de 1,5 mL. Aos 50 µL de sobrenadante adicionou-se ácido acético até o volume final de 100 µL, 1 mL de Sircol Red (1mg/mL para 1mL de ácido pícrico), mantendo-se em seguida, os tubos sob agitação a 37°C por 30 minutos.

A amostra foi então centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. Em seguida a solução corante do sobrenadante foi descartada e um período de tempo para a secagem do tubo foi aguardado. Numa próxima etapa foram adicionados 1 mL de NaOH 0,5 M, o tubo foi vigorosamente agitado para a solubilização do precipitado. Uma alíquota de 100 µL foi retirada desta preparação final e submetida à leitura utilizando-se comprimento de onda de 540 nm. O branco foi constituído apenas de NaOH 0,5 M para culturas de monocamada e de NaOH incubado em biomaterial sem célula para cultivo 3D. Estes foram decrescidos dos valores da leitura.

Este ensaio foi realizado nos tempos zero (controle), 1, 2 e 3 semanas após a indução osteogênica, tanto em culturas 2D quanto 3D. Três experimentos independentes foram realizados e cada variável foi avaliada em triplicata.

### **5.7.7 Marcação por Tetraciclina**

O meio de cultura foi retirado dos poços e descartado. Em seguida, os poços foram lavados por duas vezes com PBS 0,15M e a tetraciclina (9mg/mL) foi adicionada às culturas, com posterior incubação por 24 horas em estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Após esse período as culturas foram fixadas por 12 horas em etanol absoluto e a secagem foi feita por exposição ao ar. As culturas foram observadas e fotografadas sob luz ultravioleta a fim de evidenciar áreas mineralizadas, uma vez que a tetraciclina tem afinidade pelo cálcio. Este ensaio foi realizado em células induzidas à diferenciação osteogênica por 2 semanas tanto em culturas 2D quanto 3D.

### **5.7.8 Coloração por Von Kossa**

O meio de cultura foi retirado dos poços e descartado. Os poços foram lavados por duas vezes com PBS 0,15M e fixados com paraformaldeído 4% por 1 hora. Em seguida, as culturas foram incubadas por 30 minutos no escuro com nitrato de prata a 5%. Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada e expostos à luz ultravioleta por uma hora. O procedimento seguiu protocolo estabelecido por Ogawa et al. (2004). Este ensaio é específico para a coloração de células do tecido ósseo, bem como de suas precursoras. Secreção de matriz extracelular calcificada foi confirmada como nódulos pretos. Os nódulos foram quantificados e compilados em gráficos. Este ensaio foi realizado em células induzidas à diferenciação osteogênica por 2 semanas tanto em culturas 2D quanto 3D.

## **5.8 Estudos *in vivo***

### **5.8.1 Avaliação da Biocompatibilidade da matriz 3D através de implantes em tecido subcutâneo de ratos**

Para a avaliação da biocompatibilidade da matriz 3D *in vivo*, foram feitos implantes subcutâneos em *Rattus novogicus albinus* da linhagem Lewis transgênicos para EGFP fornecidos pelo Biotério de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Para a

realização do estudo foram utilizados 15 ratos Lewis, fêmeas, com idade entre 60 e 75 dias, pesando em média 250 gramas na data do experimento inicial.

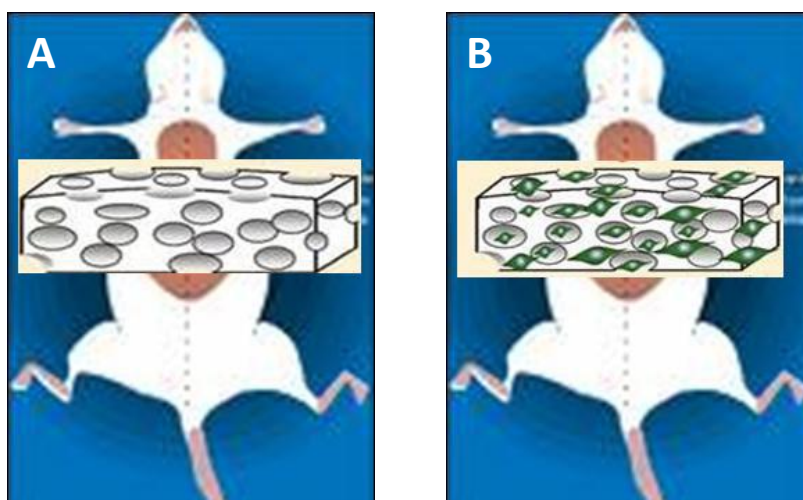
Os animais foram mantidos antes e durante o experimento, no biotério, dentro de gaiolas individuais de policarbonato autoclaváveis, de 30 a 50 cm de tamanho, com maravalha autoclavada (121°C/30min), recebendo alimentação sólida balanceada (20 grs/ dia) e água filtrada.

Para o implante subcutâneo da matriz 3D porosa os animais foram divididos em 2 grupos:

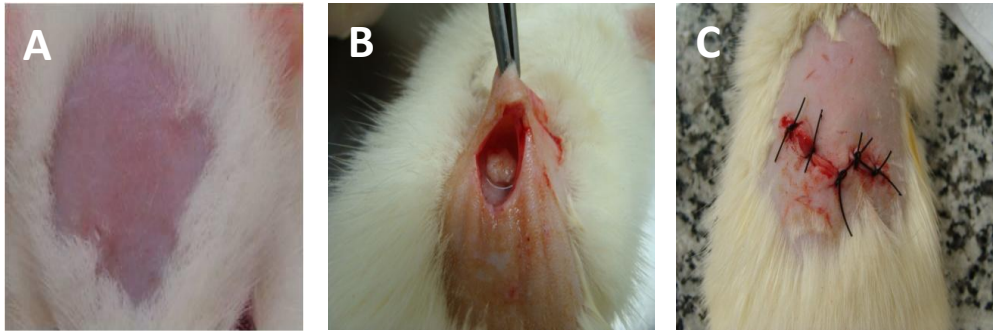
Grupo 1: Animais que receberam o implante das matrizes não colonizadas imersas em meio de cultura DMEM com SBF 10%, caracterizando o grupo controle (Figura 8A)

Grupo 2: Animais que receberam o implante de matrizes colonizadas por ASC na concentração de  $1 \times 10^6$  (Figura 8B).

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com a associação de quetamina (60 a 80 mg) e xilazina (8 a 15 mg) por kg do animal, via intramuscular. Após a sedação, o dorso dos animais foi tricotomizado e realizada a assepsia da região com PVPI, onde se realizou a incisão subcutânea e inserção da matriz (Figura 9). Após a sutura dessa região, os animais foram colocados nas respectivas gaiolas e ficaram em observação por 2 horas até o final do efeito sedativo.



**Figura 8:** Desenho experimental dos implantes em dorso de rato. (A) Implante de matriz não colonizada por ADSC. (B) implante de matriz colonizada por ADSC.



**Figura 9:** Implante de matrizes 3D em tecido subcutâneo de ratos . (A) Região tricotomizada do dorso do Rato. (B) Incisão em meia lua para introdução da matriz 3D. (C) Região do implante suturada.

As amostras coletadas foram fixadas em formaldeído 10% em tampão fosfato pH 7,0 por no mínimo 24 horas e no máximo 1 semana e incluídos em parafina para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Foram feitos cortes longitudinais de 5 a 7 $\mu$ m de espessura e corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) (Janune, 2006).

Todos os grupos tiveram suas matrizes avaliadas quanto a sua biofuncionalidade após 1, 3 e 5 semanas de implante. Coloração por hematoxilina e eosina foi realizada a fim de avaliar a promoção de neovascularização e de biodegradação da matriz *in vivo*, através de células gigantes multinucleadas. O número de novos vasos foi quantificado e compilado em gráficos.

### 5.8.2 Defeito crítico em calotas cranianas

Defeitos de tamanho crítico em calvária foram realizados de acordo com os métodos descritos anteriormente (Zou et al., 2011). Todos os experimentos deste trabalho foram apresentados e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo número 154/2006. Ratos Lewis adultos foram usados para testar o efeito osteogênico de ADSC na matriz 3D. Matrizes 3D não colonizadas ou colonizadas por ADSC foram implantadas sob anestesia por injeção intraperitoneal (10 mg/Kg peso corporal) de quetamina e xilazina (12 mg/kg peso corporal). O pelo sobre a calvária foi tricotomizado e a região foi limpa. A incisão mediana da calvária foi feita, e uma lesão de 7 mm foi realizada, penetrando através do osso calvária usando uma broca trefina com irrigação

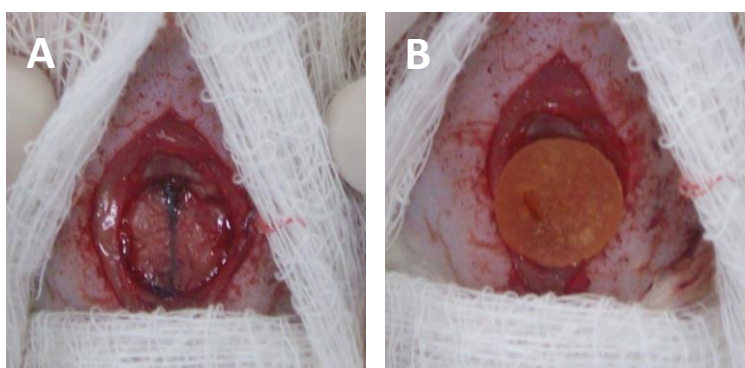
constante de PBS. Extremo cuidado foi tomado para evitar danos à dura-máter. Os animais foram distribuídos em 3 grupos (Figura 10):

Grupo 1. animais que não receberam tratamento após a lesão da calvária;

Grupo 2. animais que receberam apenas matriz 3D não colonizada por ADSC

Grupo 3. animais que receberam matrizes 3D colonizadas por ADSC

Os retalhos de tegumento foram em seguida recolocados em sua posição e suturados com linha de seda preta para odontologia número quatro (Ethicon-Johnson & Johnson). Todos os animais sobreviveram e não tiveram infecções durante o experimento. Após 4, 8 e 12 semanas, os animais foram sacrificados. As calvárias foram fixadas em paraformaldeído a 4% a 4°C por 24 h e avaliadas histologicamente. As peças foram desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) a temperatura de 2 a 8<sup>o</sup> C, por um período aproximado de quarenta dias com trocas semanais da solução desmineralizadora. Após a desmineralização, as peças passaram por processamento histológico para inclusão em Histosec-Merck®, e cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, no sentido látero- lateral foram obtidos e corados pela técnica da Hematoxilina- Eosina (H&E) (Santa Cruz), como descrito anteriormente (Zou et al., 2011).



**Figura 10:** Implante de matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina na calota craniana. (A) Defeito ósseo na calota craniana (B) Inserção da matriz 3D em defeitos ósseos

### 5.8.3 Análise imunohistoquímica

Para rastrear o destino das ADSC transplantadas nas matrizes 3D, imunohistoquímica para EGFP foi realizado. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratadas através de uma série graduada de etanol e lavados



com PBS. Os cortes foram então imersos em 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora para neutralizar a atividade da peroxidase endógena e incubados com BSA 2% em PBS (1hora) para o bloqueio dos sítios de ligação inespecífica. Posteriormente, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpos de coelho anti-GFP de rato (1:100, Abcam, Cambridge, UK). O anticorpo secundário anti-coelho biotilado (UniversalLSAB + Kit™ / HRP, Rb / Mo / Cabra K0690-1Dako, Glostrup, Dinamarca) foi aplicado por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagens em PBS, as seções foram incubadas com um conjugado peroxidase streptavidina por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com uma solução contendo 350 mM 3,3'-diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% em PBS. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. Todas as amostras foram processadas ao mesmo tempo, para evitar diferenças entre os ensaios. Controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário.

## 5.9 Análise estatística

Todos os dados quantitativos apresentados foram expressos pela média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o programa *PRISM statistical software* (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando *one-way* ANOVA, utilizando Bonferroni, sendo considerada diferenças significativa quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) e  $p < 0.001$  (\*\*\*)

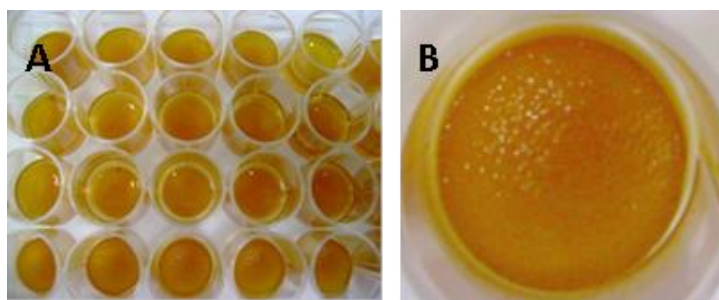
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização da matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina

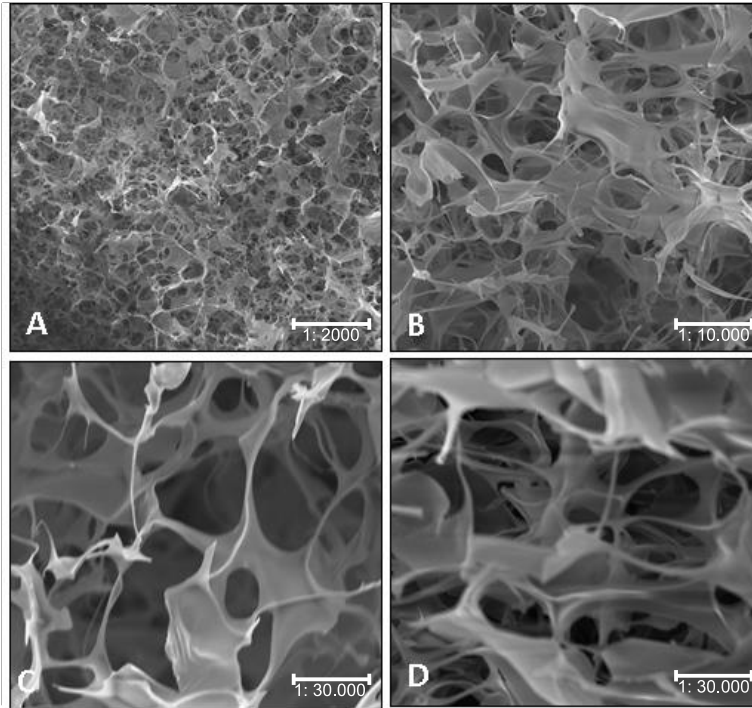
O aspecto macroscópico final e a arquitetura tridimensional da matriz 3D assemelharam-se ao de uma esponja, sendo altamente porosa e flexível, com pH 7.0, aproximadamente (Figura 11). Apesar de sua flexibilidade, esta matriz se mostrou resistente aos meios de cultivo, tanto ao controle quanto ao osteogênico, não sendo solubilizada por estes durante as seis semanas de cultura.

A fim de avaliar o tamanho dos poros, as matrizes foram processadas e submetidas à microscopia eletrônica de varredura. As matrizes obtidas neste estudo apresentaram-se altamente porosa (cerca de 90%) com poros variando de 50 a 500  $\mu\text{m}$  e com morfologia uniforme. Além disso, os poros se apresentavam interconectados (Figura 12). Seu pH se manteve constante, sofrendo pequenas alterações durante todo o período de cultivo.

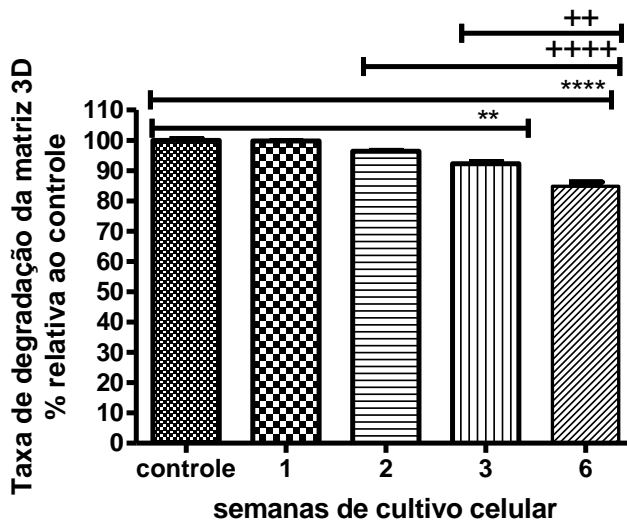
As matrizes obtidas foram submetidas a um teste de degradação hidrolítica por 6 semanas. Essas matrizes apresentaram uma pequena degradação iniciando a partir da 3<sup>a</sup> semana em contato com o meio de cultura e acentuando na semana subsequente (Gráfico 1). Entretanto essa degradação foi lenta e gradual. Estes resultados demonstraram a capacidade do uso das matrizes como um sistema de cultivo de células *in vitro* para um posterior transplante.



**Figura 11:** Aspectos macroscópicos da matriz 3D porosa de quitosana, gelatina e condroitina embebidas em álcool etílico 100%.



**Figura 12:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina. As fotomicrografias demonstram uma estrutura com poros homogênicos, interconectados, com tamanhos de 50-500 $\mu$ m.



**Gráfico 1:** Teste de degradação da matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina. Peso seco das matrizes 3D após período em contato ao meio de cultura. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) do peso da amostra em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $***p < 0.0001$  comparado ao controle;  $+++p < 0.0001$  comparando entre grupos.

Amostra	Módulo de Compressão (MPa)
1	0,10
2	0,12
3	0,10
4	0,14
5	0,18
6	0,12
Valor médio	0,13
Desvio padrão	0,03

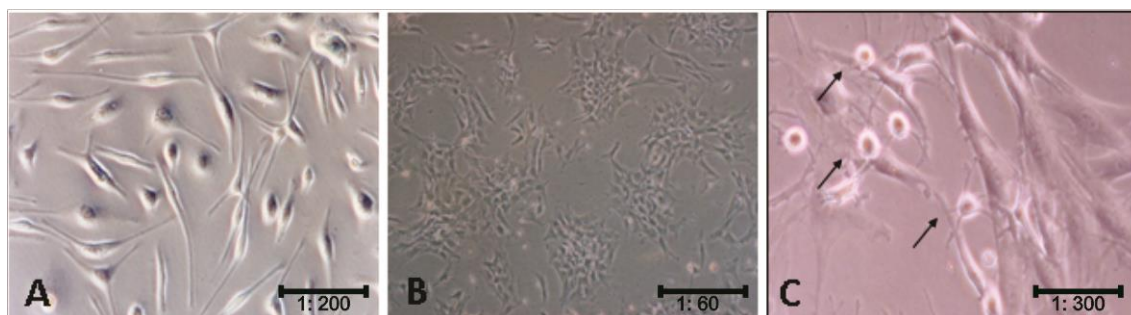
**Tabela 1:** Propriedades mecânicas da matriz 3D de quitosa, a gelatina e condroitina. Os resultados reportados são a média de seis amostras testadas.

## 6.2 Estudos *in vitro*

### 6.2.1 Morfologia e cultivo de ADSC

Após os procedimentos descritos na metodologia foram obtidas culturas de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas em meio controle (DMEM+10% de SFB) em garrafas de cultura 75 mm<sup>3</sup>. A observação dessas culturas ao microscópio óptico revelou uma população de células fusiformes, semelhantes a fibroblastos (Figura 13A) que formavam colônias (Figura 13B). Estas células apresentavam ainda aderência seletiva à superfície plástica. Além disso, até a quarta passagem esses tipos celulares mantiveram seu fenótipo estável, sem sinais de senescência conservando suas características de aderência e morfologia fibroblastóide.

Entretanto, foi possível verificar uma população celular com características morfológicas e comportamentais típicas de células hematopoiéticas, como formato arredondado e não aderência à superfície plástica da placa de cultura, (Figura 13C). Contudo, por sua capacidade não aderente, com a troca diária do meio de cultura, a população dessas células diminuía. Aproximadamente após a terceira renovação de meio, não foi observada a presença dessas células, restando apenas células com aderência seletiva e potencial de auto-renovação, estabelecendo-se assim culturas homogêneas.



**Figura 13:** Cultura de células-tronco derivadas de tecido adiposo em meio controle. Observar a morfologia típica fibroblastóide (A) e a formação de colônias (B). Após a extração de ADSC, outros tipos celulares arredondados e sem aderência à placa de cultura foram visualizados (C-setas pretas). Visualização ao microscópio óptico, aumento 200x (A) 60x (B) e 300x (C).

### 6.2.2 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo e imunofluorescência

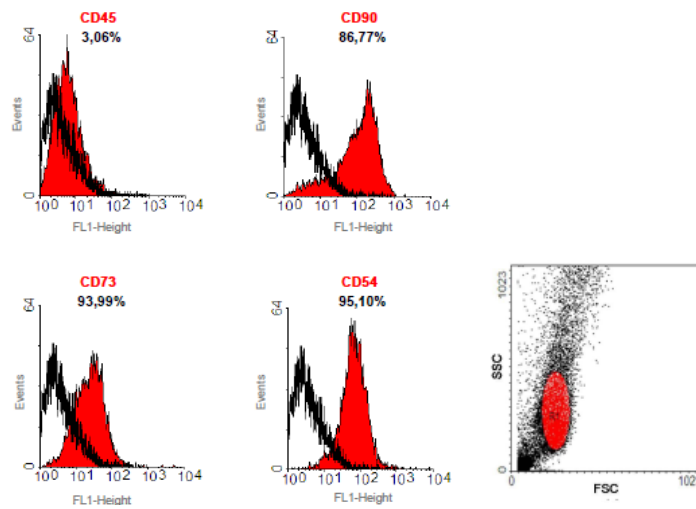
Uma população celular pode ser definida através de sua morfologia, comportamento e análise dos tipos de antígenos expressos na membrana plasmática de suas células (CD - *cluster of differentiation*). Para analisar o fenótipo celular através da expressão das moléculas de superfície, foram realizados ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência.

Células indiferenciadas foram incubadas com anticorpos monoclonais selecionados a fim de avaliar a expressão de CD54, CD73 e CD90, moléculas eleitas para a caracterização das células-tronco mesenquimais. Como controle negativo, a expressão da molécula CD45 foi avaliada, uma vez que esta é característica de células-tronco hematopoiéticas.

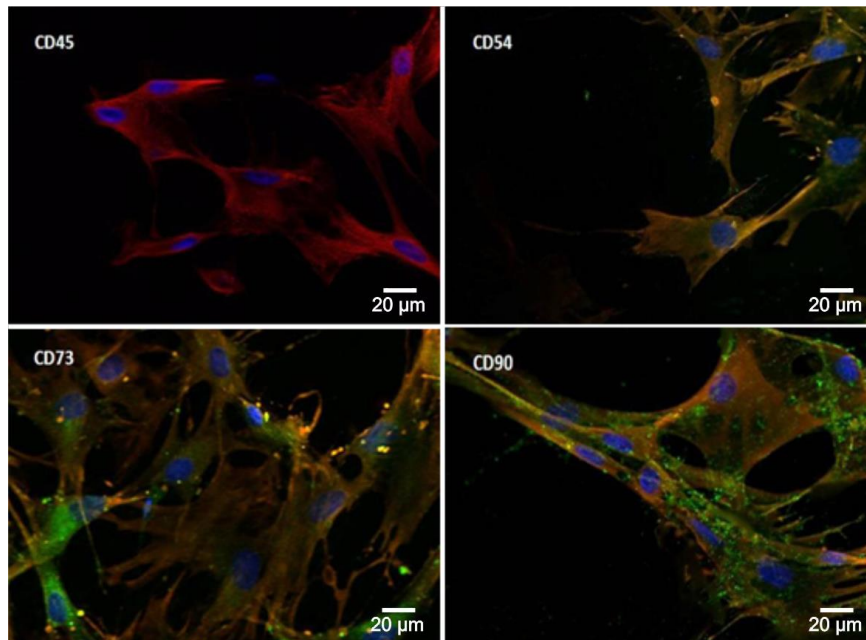
Cerca de 87% da população avaliada expressavam CD90, 94% expressaram CD73 e 95%, CD54. CD45 foi detectado em apenas 3% das células analisadas. O conjunto de marcadores utilizados permitiu inferir que a população celular isolada e cultivada era homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoiética. Os dados obtidos foram reunidos em um histograma (Figura 14).

A fim de comprovar qualitativamente o fenótipo da população estudada, ensaios de imunofluorescência foram realizados. O ensaio de imunofluorescência foi realizado com as células ADSC-EGFP derivadas animais da linhagem Lewis transgênicos para a proteína GFP. Foram utilizados os mesmos anticorpos monoclonais no ensaio de citometria de fluxo, além do anticorpo anti-EGFP. Através das imagens de sobreposição, obtidas em microscopia confocal, pode-se verificar que as células expressavam CD54, CD73 e CD90 e não expressavam CD45. Além disso, células-

tronco provenientes de ratos EGFP, marcaram-se positivas para essa proteína. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst (Figura 15).



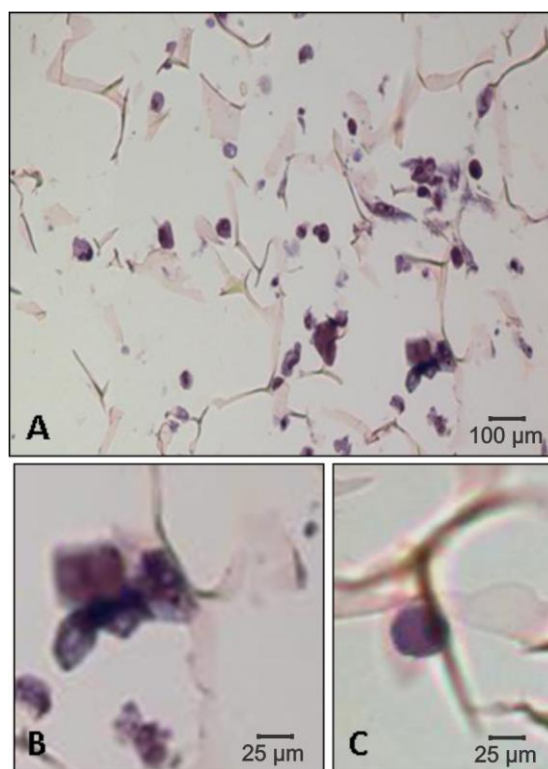
**Figura 14.** Análise fenotípica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo por citometria de fluxo. Foram avaliadas as expressões das seguintes moléculas de superfície: CD45, CD54, CD73 e CD90. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. O pico preto vazio corresponde às células-tronco não marcadas (controle negativo). O pico vermelho preenchido corresponde às células-tronco marcadas com anticorpos fluorescentes. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população no gráfico à direita.



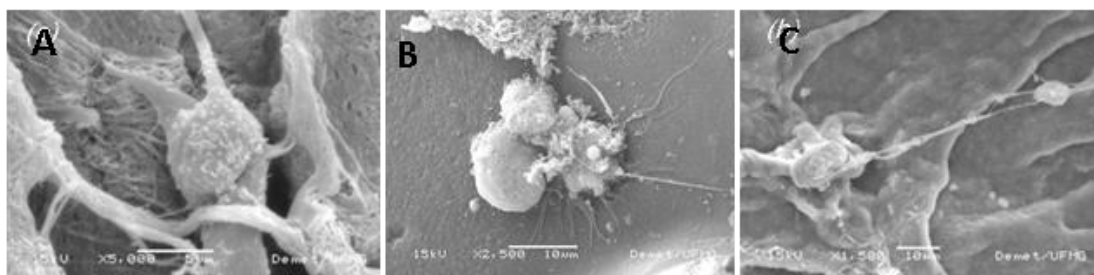
**Figura 15.** Análise fenotípica de ADSC – EGFP por imunofluorescência. ADSC marcaram positivas para CD54, CD73, CD90 (verde - Alexa 488), GFP (vermelho - Alexa 555) e negativas para CD45. O núcleo está marcado com Hoechst (azul). Imagem obtida através da microscopia de confocal LSM 510 Meta (sobreposição).

### 6.2.3 Análise da colonização da matriz 3D por de células-tronco mesenquimais

Após a caracterização física das matrizes porosas, células-tronco foram semeadas para testes de citotoxicidade da matriz e diferenciação osteogênica das ADSC. Três dias após a semeadura, a matriz 3D se manifestou capaz de permitir a colonização celular, além de se manifestar atóxica à ADSC. Através de cortes morfológicos, foi possível observar células-tronco distribuídas por toda a malha da matriz 3D, isoladas ou em grupos (Figura 16). As células cultivadas em biomaterial apresentaram-se alongadas, com prolongamentos e formato fibroblastóide, além de diversos pontos de adesão ao material (Figura 17 A/B). A manutenção destas características determina a presença de células com padrão fenotípico normal. As células encontraram-se isoladas (Figura 17A) em grupos (Figura 17B) ou interconectadas (Figura 17C). Em algumas áreas das amostras, foi possível visualizar prolongamentos celulares demonstrando o estabelecimento de interconectividade celular (Figura 17C).



**Figura 16:** Cortes morfológicos de matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina após três dias de colonização por células-tronco mesenquimais de tecido adiposo. H&E. As células se encontraram distribuídas por toda a malha da matriz (A) em grupos (B) ou isoladas (C).



**Figura 17:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de matriz 3D colonizadas por células-tronco mesenquimais de tecido adiposo por 3 horas. Células aderidas à superfície da matriz são visualizadas. Algumas células possuíam o formato fibroblastóide e se encontravam isoladas (A). A maioria delas, porém estavam reunidas em grupos, emitiam prolongamentos (B) e estabeleciam interconectividade celular (C).

#### 6.2.4 Análises das culturas de células-tronco mesenquimais em monocamada (2D) e matriz 3D

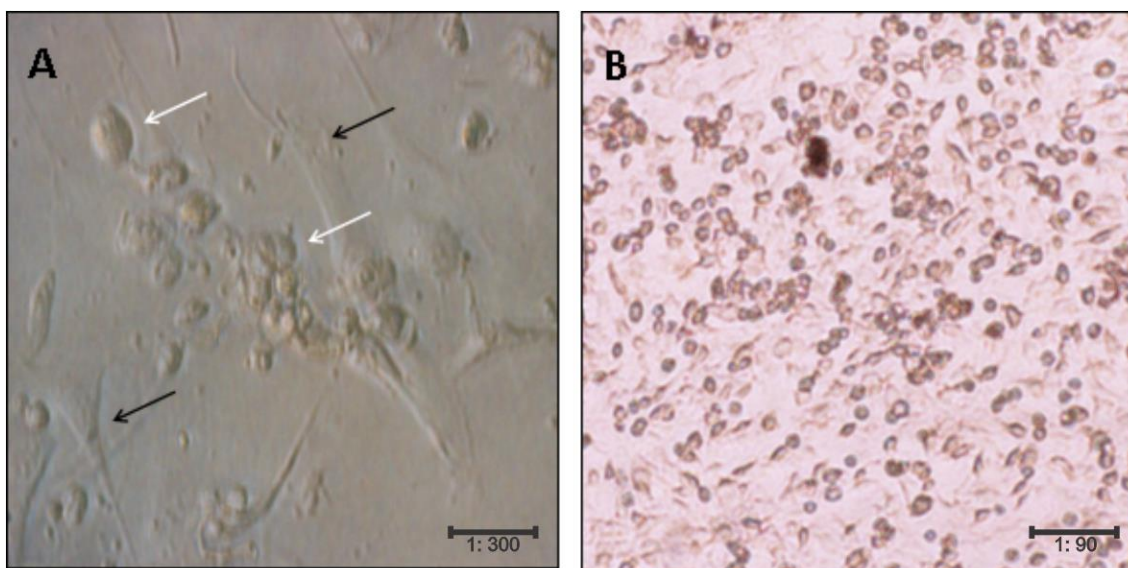
Após a contratação do potencial de colonização, aderência e interconectividade das ADSC no biomaterial, esse tipo celular foi induzido à diferenciação osteogênica em culturas 2D e 3D. As culturas foram acompanhadas através de microscopia óptica durante 3 semanas. Foi estabelecido que a semana 0 (zero) corresponderia ao período de 24 horas após a semeadura e cultivo das células em meio controle, sendo portanto o controle. Após esse período, adicionou-se meio osteogênico, sendo determinados como semana 1, 2, e 3 os respectivos períodos de cultivo com meio indutor. Durante todo o período de acompanhamento das culturas foram analisados os perfis morfológicos e comportamentais das células através de microscopia óptica.

Posteriormente a adição do meio de indução osteogênica, ocorreu uma discreta mudança na morfologia celular. As células-tronco mesenquimais tiveram seus prolongamentos retraídos sendo sua morfologia inicialmente fusiforme, substituída pelo formato cubóide (Figura 18). As células foram gradativamente alterando seu perfil fenotípico a partir da 1ª semana de indução osteogênica, atingindo o ponto elevado de diferenciação entre 2ª e 3ª semanas de cultivo com meio indutor (Figura 18). Neste período as células adquiriram uma morfologia completamente diferente da inicial, apresentando-se totalmente cubóides.

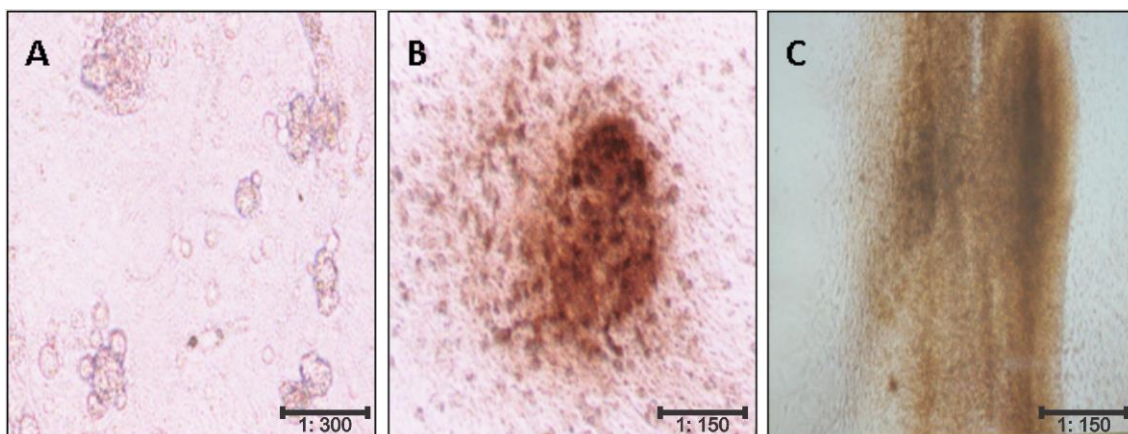
Durante todo o período de cultivo, as culturas mantiveram-se estáveis, aderidas à placa de cultura. Entretanto as células passaram a secretar uma substância esbranquiçada, a matriz extracelular. Além disso, as células começaram a se aglomerar em estruturas conhecidas como nódulos ósseos. Essas estruturas manifestavam-se a



partir da 1ª semana de indução osteogênica, sendo mais proeminentes em número e tamanho entre a 2ª e 3ª semanas após a indução (Figura 19).



**Figura 18:** Cultura de células-tronco derivadas do tecido adiposo em meio osteogênico. A. Após 1 semana em cultivo osteogênico as células iniciaram a mudança morfológica. Algumas células ainda possuíam formato fibroblastóide (setas pretas) enquanto outras apresentavam formato cuboidal (setas brancas). B. Após 2 semanas de indução osteogênica a grande maioria dos tipos celulares demonstraram formato cuboidal. Visualização ao microscópio óptico, aumento 300x (A) e aumento 90x (B).



**Figura 19:** Visualização de nódulos ósseos em culturas ADSC após 1 (A), 2 (B) e 3 (C) semanas da adição de meio de indução osteogênica. (A) aumento de 300x (B/C) aumento de 150x.

Avaliações morfológicas, bioquímicas e comportamentais das células em contato com a matriz porosa fornecem dados sobre a citotoxicidade do biomaterial. Citotoxicidade é o potencial de um material em produzir efeitos letais ou sub-letais em sistemas biológicos em nível celular. A liberação de substâncias tóxicas pelo material

pode provocar lesões celulares, além de interferir em suas atividades metabólicas. Dessa forma, a fim de comprovar o potencial osteogênico celular e a influência e atoxicidade da matriz porosa, ADSC foram cultivadas tanto em cultura 2D quanto em matriz 3D e submetidas a ensaios determinantes.

As culturas foram avaliadas quanto a sua viabilidade, proliferação, atividade da enzima fosfatase alcalina e produção de colágeno total. Além disso, colorações específicas para osteogênese, como Von Kossa e marcação por Tetraciclina, foram realizadas. Essas análises foram realizadas no tempo controle, 1, 2, e 3 semanas após indução osteogênica.

As culturas celulares em matrizes tridimensionais foram nomeadas de culturas tridimensionais (3D), enquanto as culturas celulares em monocamada foram nomeadas de culturas bidimensionais (2D). Para monitorar e evidenciar o efeito da matriz no crescimento e diferenciação das células tronco, culturas 2D foram utilizadas como referência.

### **6.2.5 Metabolização do MTT**

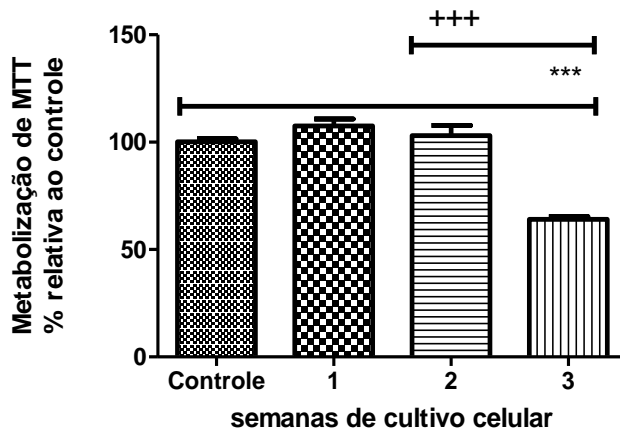
Culturas de ADSC foram testadas quanto à viabilidade celular através da reação de metabolização do MTT nas semanas 0, 1, 2 e 3 cultivadas em monocamada e matriz tridimensional. Neste ensaio, a quantidade de cristais de Formazan observada é proporcional à quantidade de células viáveis da cultura.

Os resultados de metabolização de MTT foram expressos em porcentagens, considerando 100% da atividade metabólica o valor da densidade ótica (DO) obtida no controle lidos no comprimento de onda de 595 nm.

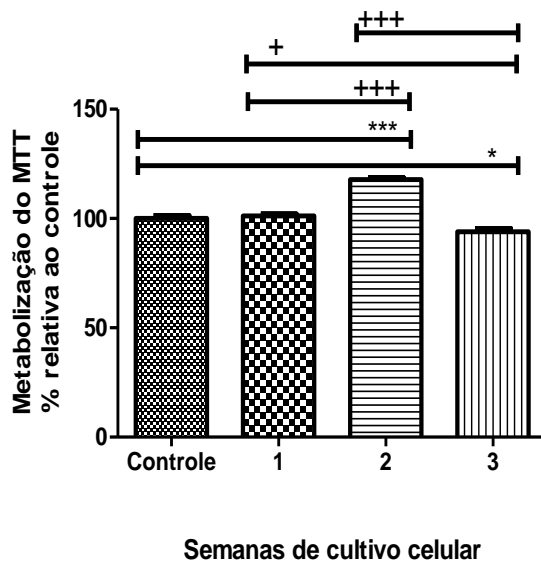
Em cultura bidimensional de ADSC, a taxa de formação de cristais de formazan manteve-se constante em relação ao controle até a segunda semana de indução osteogênica, sofrendo decréscimo estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) de cerca de 40% na terceira semana de cultivo (Gráfico 2). Estes resultados apresentados no gráfico 1 foram confirmados através da representação fotográfica das culturas (Figura 20).

Quando cultivadas em matriz tridimensional, ADSC apresentaram um aumento ( $p < 0,0001$ ) cerca de 20% na metabolização do MTT a partir da segunda semana de cultivo. Esse valor sofreu decréscimo ( $p < 0,005$ ) cerca de 10% em relação ao controle

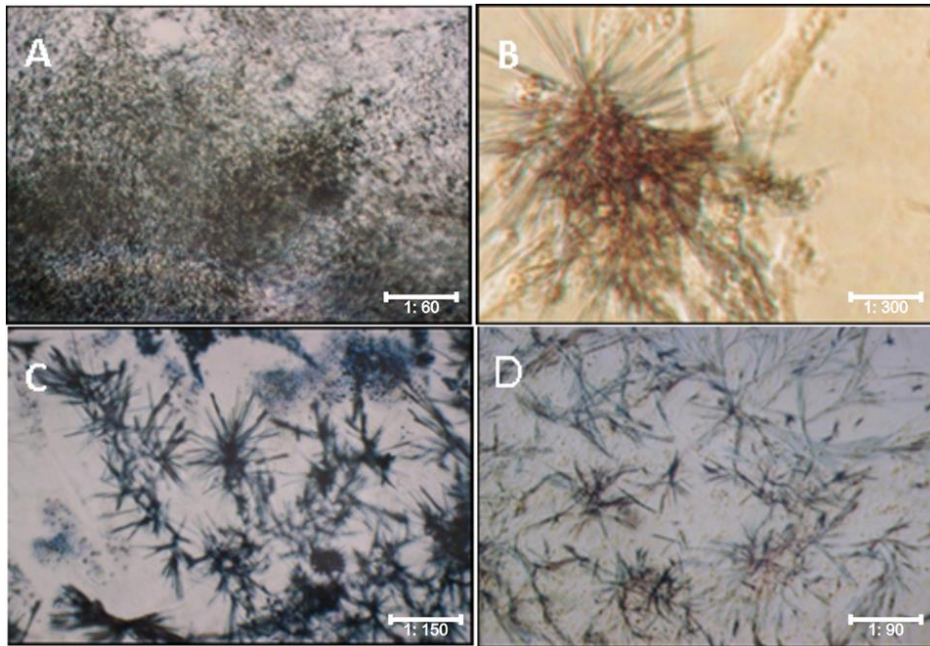
na semana seguinte (Gráfico 3). Esses resultados sugerem baixa citotoxicidade da matriz 3D, além de permitir a proliferação celular.



**Gráfico 2:** Metabolização do MTT por ADSC em cultivo 2D - Leitura da absorbância dos cristais de formazan de células tronco derivadas do tecido adiposo cultivadas em monocamada na presença de meio osteogênico. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) de metabolização de MTT em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $^{***}p < 0.0001$  comparado ao controle;  $^{+++}p < 0.0001$  comparando entre grupos.



**Gráfico 3:** Metabolização do MTT por ADSC em cultivo 3D - Leitura da absorbância dos cristais de formazan de células tronco derivadas do tecido adiposo cultivadas em matriz 3D na presença de meio osteogênico. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) de metabolização de MTT em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $^{*}p < 0.05$  comparado ao controle;  $^{+}p < 0.05$  comparado entre grupos.  $^{***}p < 0.0001$  comparado ao controle;  $^{+++}p < 0.0001$  comparado entre grupos.



**Figura 20:** Formação dos cristais de formazan em cultura 2D de ADSC. ADSC me meio controle (A) e 1 (B), 2 (C) e 3 (D) semanas após a indução osteogênica. Aumentos de 60x, 300x, 150x e 90x, respectivamente.

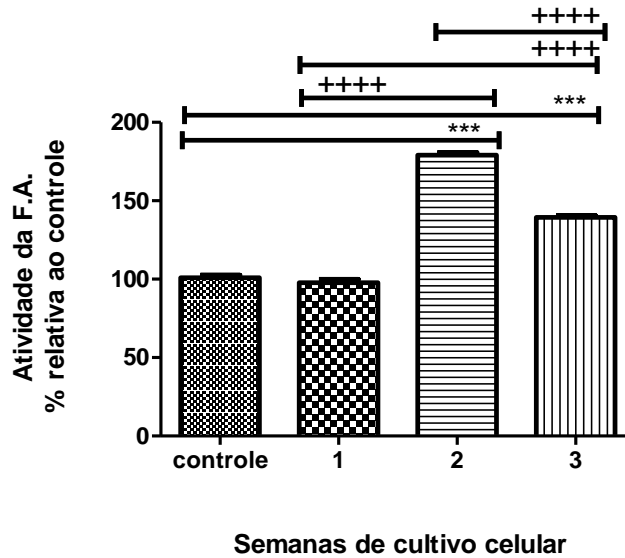
### 6.2.6 Atividade da Fosfatase Alcalina

Através da mensuração da atividade da enzima Fosfatase Alcalina, é possível avaliar o nível de diferenciação osteogênica, visto que esta é um marcador celular precoce tanto de células-tronco quanto de osteoblastos.

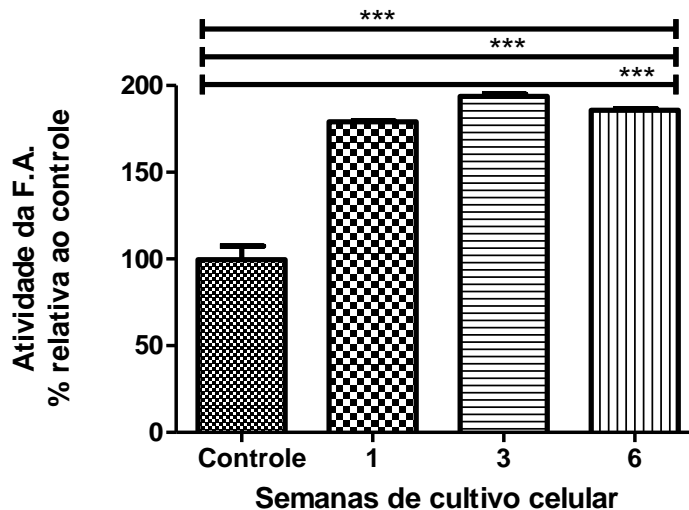
Os resultados da análise da atividade da FA pelas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo em culturas bi e tridimensionais, após indução osteogênica, foram expressos em porcentagem de atividade enzimática considerando 100% de atividade a leitura da DO lida no controle no comprimento de onda de 595 nm.

A atividade de fosfatase alcalina foi detectada em culturas 2D e 3D em ambos os meios de cultura para todos os períodos avaliados. Em culturas bidimensionais de ADSC, a produção de fosfatase alcalina aumentou significativamente ( $p < 0.0001$ ) a partir da segunda semana de cultivo. Em relação ao controle, esse acréscimo foi de aproximadamente 80%. Entretanto na 3ª semana de cultivo, houve um discreto decréscimo ( $p < 0.0001$ ), de 30%, dessa atividade quando comparada a semana anterior. Apesar do decréscimo, houve ainda aumento significativo de cerca de 50% superiores aos resultados do controle (Gráfico 4). Os resultados apresentados no gráfico 4 foram confirmados através da representação fotográfica das culturas (Figura 21).

Em ADSC cultivadas em matriz 3D, a produção de fosfatase alcalina aumentou significativamente ( $p < 0.0001$ ) a partir da 1ª semana de cultivo. Esse aumento manteve-se nas semanas subsequentes, atingindo níveis de 80%, 95% e 80% na 1ª, 2ª e 3ª semana de cultura, respectivamente, em relação àquela apresentado pelo grupo controle (Gráfico 5).

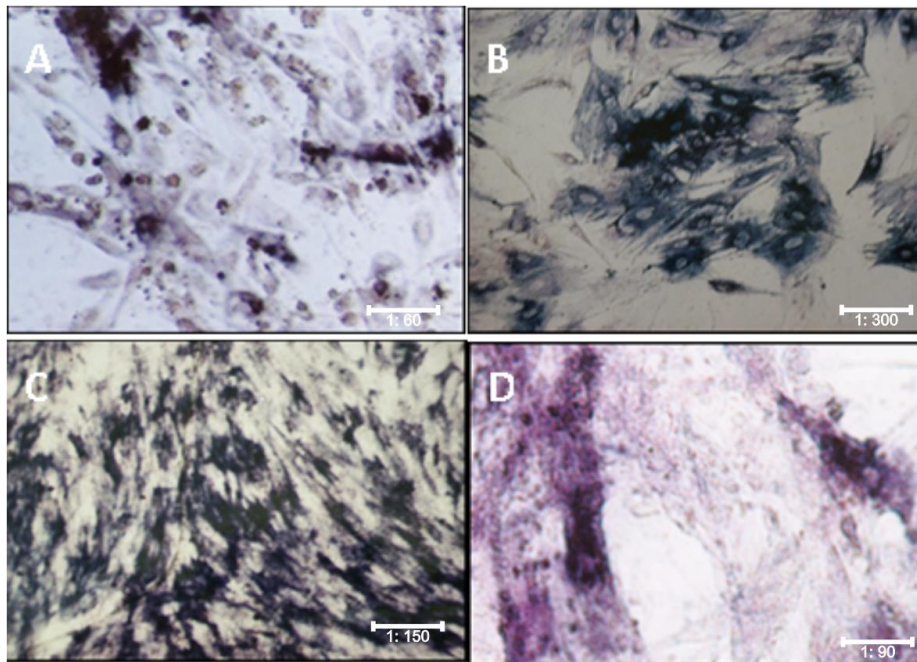


**Gráfico 4:** Produção de Fosfatase Alcalina por ADSC em cultivo 2D - Leitura da absorbância da atividade da fosfatase alcalina em células tronco derivadas do tecido adiposo cultivadas em monocamada na presença de meio osteogênico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) da atividade da FA em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $^{***} p < 0.0001$  comparado ao controle



**Gráfico 5:** Produção de Fosfatase Alcalina por ADSC em cultivo 3D - Leitura da absorbância da atividade da fosfatase alcalina em células tronco derivadas do tecido adiposo cultivadas em matriz 3D na presença de meio osteogênico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) da atividade da FA em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $^{***} p < 0.0001$  comparado ao controle



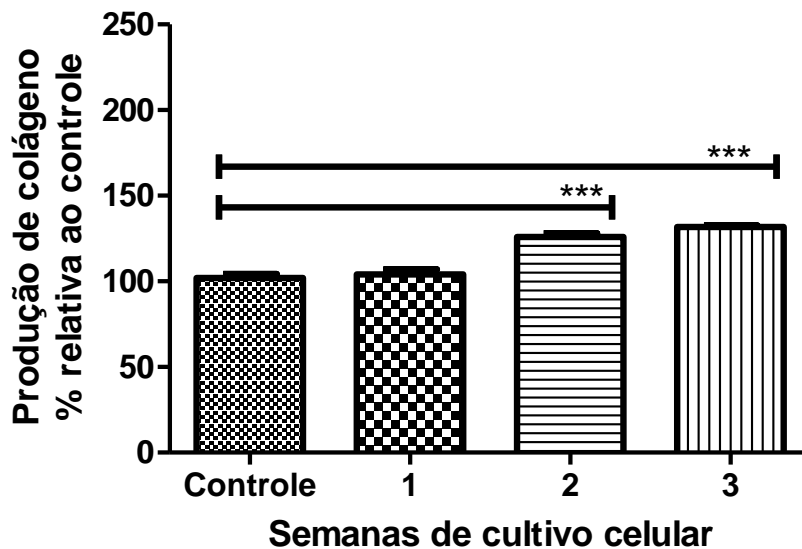


**Figura 21:** Produção de Fosfatase Alcalina em culturas 2D de ADSC. ADSC em meio controle (A) e 1 (B), 2 (C) e 3 (D) semanas após a indução osteogênica. Aumentos de 60x, 300x, 150x e 90x, respectivamente.

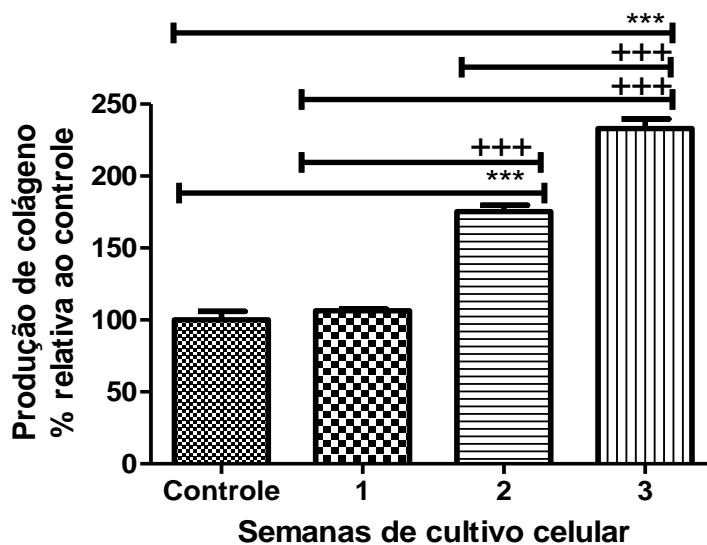
### 6.2.7 Dosagem de colágeno total

O teste de colágeno foi realizado com intuito de avaliar o processo de diferenciação celular, uma vez que células de linhagem osteogênica são sabidamente produtoras de colágeno. Os resultados obtidos com esse ensaio demonstraram que, quando cultivadas em monocamada, a produção de colágeno adquire níveis cerca de 30% superiores em relação ao controle, a partir da 2ª semana de cultivo e se mantém na semana seguinte (Gráfico 6). Esses resultados podem ser visualizados pela figura 22.

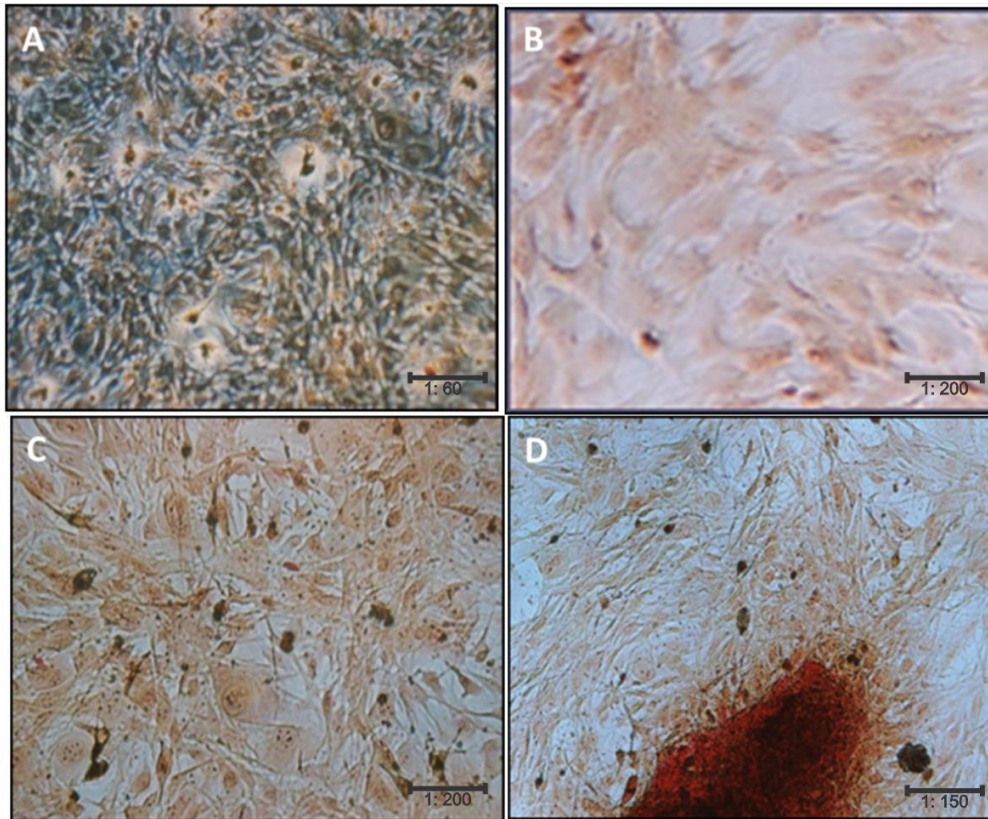
Quando cultivadas em matriz 3D, os níveis de produção de colágeno aumentaram ( $p < 0.0001$ ) a partir da 2ª semana de cultivo. Os índices obtiveram um aumento de 60% na 2ª semana, enquanto que na 3ª semana a síntese de colágeno foi cerca de 130% superior àquela observada no controle (Gráfico 7).



**Gráfico 6:** Produção de colágeno por ADSC em cultivo 2D - Leitura da absorbância detectada através da ligação Sircol Red/colágeno no sobrenadante da cultura 2D de células tronco derivadas de tecido adiposo na presença de meio osteogênico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) da atividade da FA em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $***p < 0.0001$  comparado ao controle



**Gráfico 7:** Produção de colágeno por ADSC em cultivo 3D - Leitura da absorbância detectada através da ligação Sircol Red/colágeno no sobrenadante da cultura 3D de células tronco derivadas de tecido adiposo na presença de meio osteogênico. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem (%) de metabolização de MTT em triplicata. \*apresenta a diferença estatística significativa  $***p < 0.0001$  comparado ao controle;  $+++p < 0.0001$  comparado entre grupos.



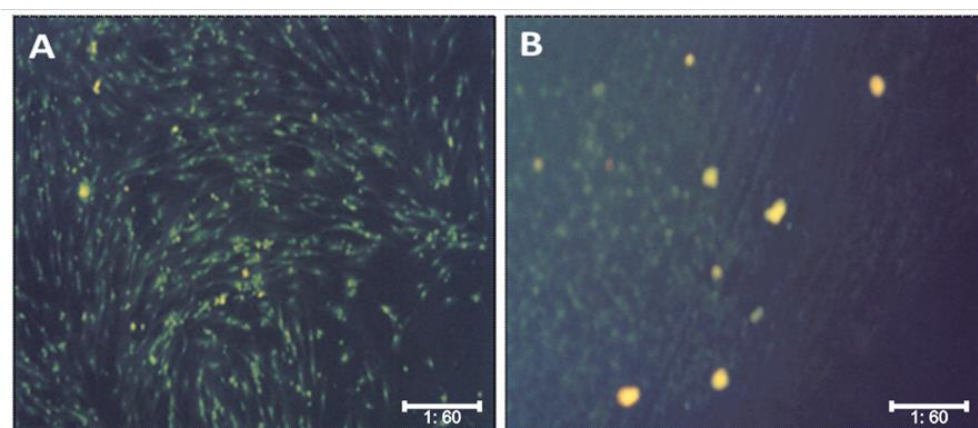
**Figura 22:** Marcação de colágeno celular em culturas 2D de ADSC. ADSC me meio controle (A) e 1 (B), 2 (C) e 3 (D) semanas após a indução osteogênica. Aumentos de 60x, 200x, 200x 150x, respectivamente.

### 6.2.8 Coloração de estruturas mineralizadas

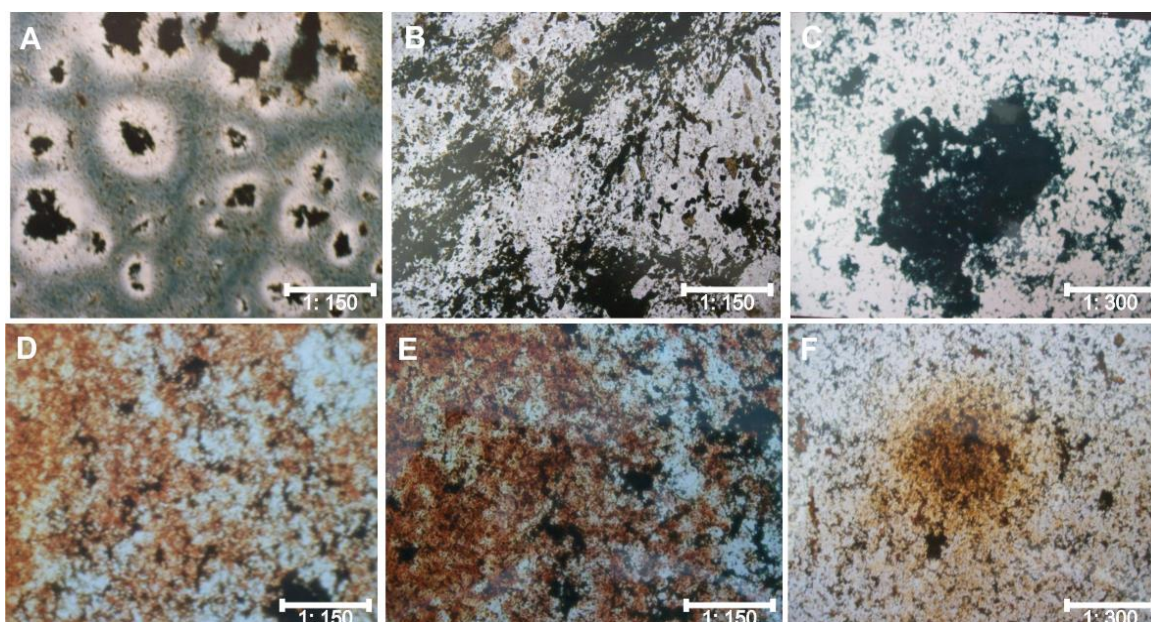
A fim de identificar a mineralização das estruturas visualizadas, coloração do tipo Von Kossa e marcação por Tetraciclina, foram realizadas. Estes dois tipos de coloração são utilizados a fim de obter constatação quanto à formação de estruturas mineralizadas, indicadoras de células de linhagem osteogênica.

Ambas as culturas (2D e 3D) coraram-se positivamente por Tetraciclina (Figura 23) e Von Kossa (Figura 24) evidenciando a osteogênese de ADSC. Os nódulos de mineralização revelados por Von Kossa foram quantificados e compilados em gráficos. O número de nódulos de mineralização em culturas 2D foi menor que em culturas 3D. Em culturas de monocamada, esta contagem foi de cerca de 2, 6 e 8 nódulos por campo após 1, 2 e 3 semanas de indução osteogênica, respectivamente (Gráfico 8). Já em culturas 3D, a quantificação de nódulos de osso foi de 7, 16 e 26 nódulos por campo após 1, 2 e 3 semanas de indução osteogênica, respectivamente (Gráfico 9).

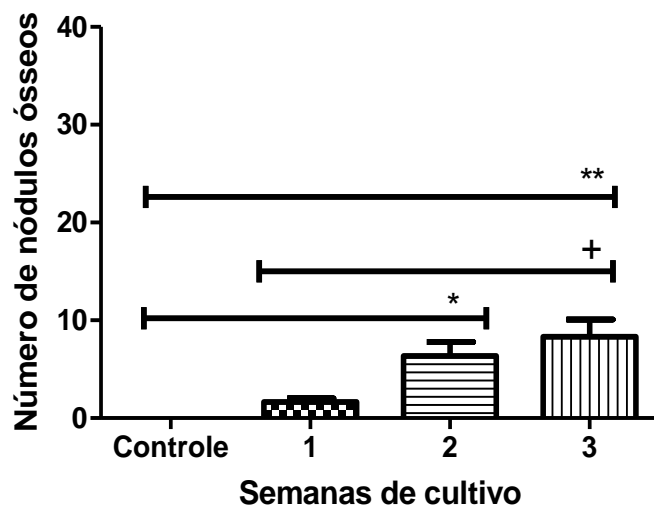




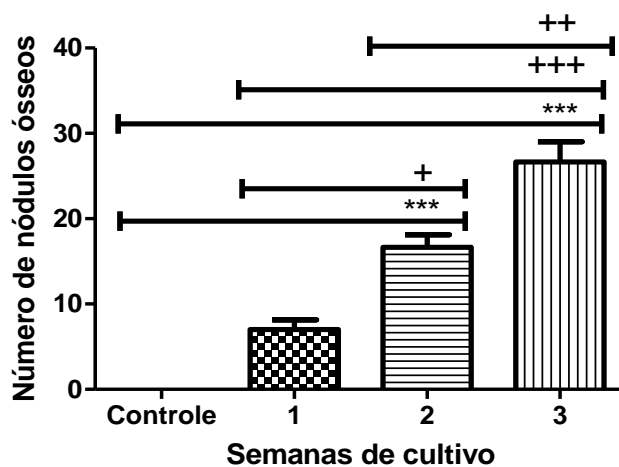
**Figura 23:** Visualização de estruturas mineralizadas por marcação por Tetraciclina. (A) Cultura 2D de ADSC após 2 semanas de indução osteogênica. Aumento de 60x. (B) Cultura 3D de ADSC após 2 semanas de indução osteogênica. Aumento de 60x.



**Figura 24:** Visualização de estruturas mineralizadas por coloração do tipo Von Kossa. Cultura 2D de ADSC após 1 (A) 2 (B) e 3(C) semanas de indução osteogênica. Aumento de 150x (A/B) e 300x (C). Cultura 3D de ADSC após 1 (D) 2 (E) e 3 (F) semanas de indução osteogênica. Aumento de 150x (D/E) e 300X (F).



**Gráfico 8:** Quantificação de estruturas mineralizadas em cultura 2D. Resultados são apresentados como a média + /- SD de triplicatas de três experimentos. \* p<0,05 em comparação com controles; + p <0,05 comparação entre os grupos. \*\* p <0,002 em comparação com controles; ++ p <0,002 comparação entre os grupos.

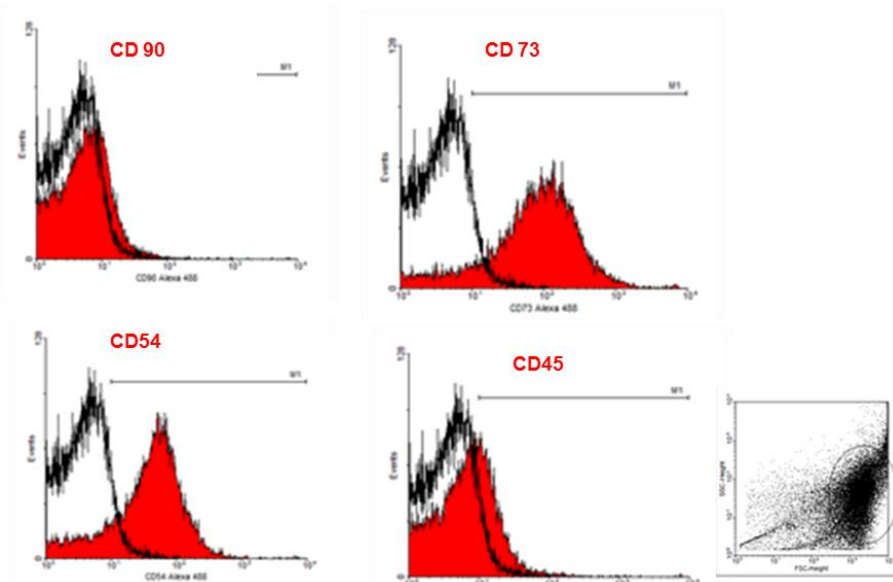


**Gráfico 9:** Quantificação de estruturas mineralizadas em cultura 3D. Resultados são apresentados como a média + /- SD de triplicatas de três experimentos. \* p<0,05 em comparação com controles; + p <0,05 comparação entre os grupos. \*\* p <0,002 em comparação com controles; ++ p <0,002 comparação entre os grupos.

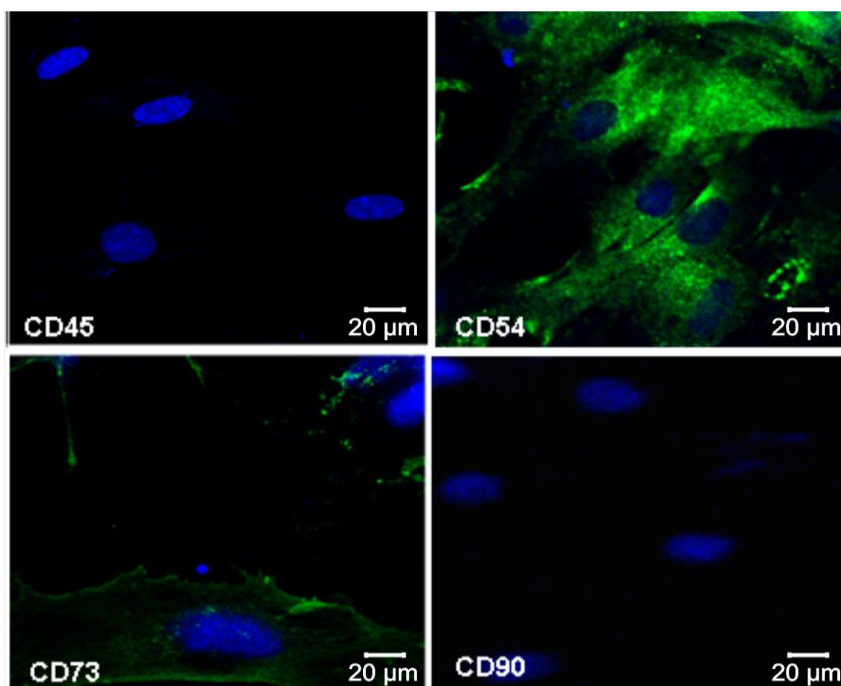
### 6.2.9 Análise da osteogênese de ADSC por citometria de fluxo e imunofluorescência

Após a indução osteogênica, nova análise fenotípica dos tipos de antígenos expressos na membrana plasmática celular foi realizada por citometria de fluxo e imunofluorescência. Células submetidas à diferenciação osteogênica por 30 dias foram incubadas com anticorpos monoclonais selecionados a fim de avaliar a expressão de CD54, CD73, CD90, moléculas eleitas para a caracterização das células-tronco mesenquimais. Como controle negativo, a expressão da molécula CD45 foi avaliada, uma vez que esta é característica de células-tronco hematopoiéticas.

Constatou-se que a população celular após a indução osteogênica manifestou-se mais granulosa. Além disso, células diferenciadas continuaram exibindo o padrão encontrado em ADSC indiferenciadas, exceto por terem perdido a expressão de CD90. Os dados obtidos foram reunidos em um histograma (Figura 25). A fim de comprovar qualitativamente o fenótipo da população celular após 30 dias de indução osteogênica, ensaios de imunofluorescência foram realizados. Através das imagens obtidas em microscopia confocal, pode-se verificar que as células não expressavam CD45. Esses tipos celulares submetidas a cultura com meio osteogênico expressavam CD54 e CD73, entretanto deixaram de expressar CD90. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst (Figura 26).



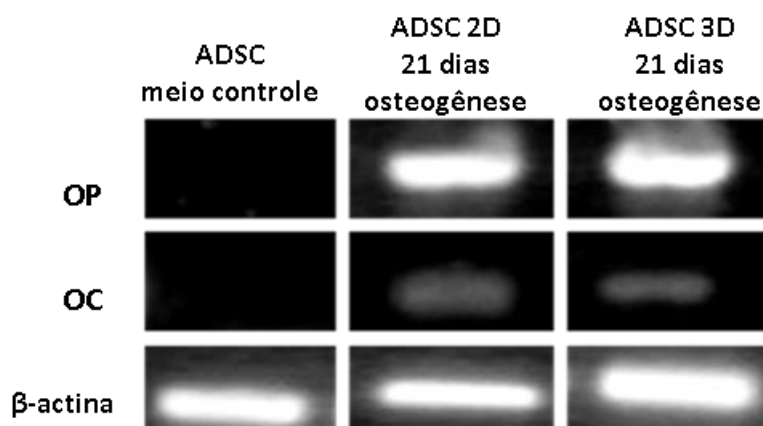
**Figura 25.** Análise fenotípica de ADSC por citometria de fluxo após 30 dias de indução osteogênica. Foram avaliadas as expressões das seguintes moléculas de superfície: CD45, CD90, CD73 e CD54. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. O pico preto vazio corresponde às células tronco não marcadas (controle negativo). O pico vermelho preenchido corresponde às células tronco marcadas com anticorpos fluorescentes. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população R1.



**Figura 26.** Análise fenotípica de ADSC por imunofluorescência após 30 dias de indução osteogênica. ADSC marcaram positivas para CD54, CD73 (verde - Alexa 488) e negativas para CD45 e CD90. O núcleo está marcado com Hoechst (azul). Imagem obtida através da microscopia de confocal LSM 510 Meta (sobreposição).

#### 6.2.10 Análise da osteogênese por RT-PCR

A fim de confirmar o comprometimento das culturas celulares com a linhagem osteogênica, a expressão de proteínas relevantes no processo osteogênico, tais como osteopontina e osteocalcina, foi avaliada. A expressão de  $\beta$ -actina foi avaliada como controle da reação (Figura 27). Tais proteínas foram detectadas após 21 dias de indução osteogênica, tanto em cultivo 2D quanto 3D, o que não ocorreu em células não induzidas. A proteína  $\beta$ -actina foi expressa em todos os tempos do experimento, validando a PCR.



**Figura 27:** Detecção de osteopontina e osteocalcina em culturas 2D e 3D submetidas a 21 dias de estímulo osteogênico. Canaleta 1. ADSC sem estímulo osteogênico; Canaleta 2. ADSC em cultivo 2D; Canaleta 3. ADSC em cultivo 3D. OP. Osteopontina; OC. osteocalcina.  $\beta$ -actina, proteína constitutiva expressa por todas as células utilizada como controle positivo da reação.

## 6.3 Estudos *in vivo*

### 6.3.1 Avaliação da Biocompatibilidade *in vivo* da matriz 3D através de implantes subcutâneos

As células-tronco, bem como os biomateriais, vêm sendo estudadas por meio de vários modelos experimentais. O modelo experimental utilizado no presente trabalho mostrou-se de fácil execução e boa reprodutibilidade. Ratos da linhagem Lewis foram selecionados na realização deste trabalho por serem animais facilmente mantidos em biotério, além de serem isogênicos, o que descarta a possibilidade de rejeição às células injetadas e torna desnecessário o uso de imunossupressores.

De acordo com a metodologia já descrita avaliou-se a resposta tecidual de dois grupos com a matriz 3D implantada em tecido subcutâneo da região torácica dorsal. Ao microscópio de luz foram analisadas lâminas contendo os cortes histológicos dos implantes corados com hematoxilina-eosina, nas quais se observa a estrutura das matrizes 3D e a resposta tecidual em função das alterações inflamatórias, tais como proliferação angioblástica, fibroblástica e infiltrado inflamatório (Figuras 28 e 29). É sabido que a entrada de corpos estranhos no organismo acarreta reações inflamatórias a fim de eliminar as causas da agressão. A partir da 4ª semana de acompanhamento dos animais que foram submetidos ao processo de implantação, já se observava a completa

reabsorção dos fios de sutura e a reepitelização da região de inserção do implante, além do crescimento de novos pêlos, povoando a região.

Nos períodos pré-estabelecidos (1, 3 e 5 semanas), os animais foram eutanasiados com *overdose* de anestésico e o implante, juntamente com as regiões subjacentes, foram retirados de forma cirúrgica e fixado em formaldeído 10%. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina e realizado 3 cortes histológicos de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de cada animal que foram corados com H&E, a fim de avaliar o processo inflamatório causado pela introdução subcutânea das matrizes 3D não colonizadas e colonizadas por células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.

Em todas as avaliações, não houve resposta que demonstrasse perda do controle homeostático. De forma que não se observou em nenhum dos cortes analisados presença de focos necróticos, tanto na região do implante quanto nos tecidos adjacentes.

Descreveu-se a região do implante em todos os períodos e situações avaliados, em relação à resposta inflamatória, como crônica, com proliferação fibroblástica discreto em torno do implante, ocorrendo formação de um tecido granuloso, e infiltrado celular. Células gigantes multinucleadas também foram observadas. Entretanto, a resposta inflamatória pouco afetou a função dos tecidos, não comprometendo o organismo como um todo (Figuras 28 e 29).

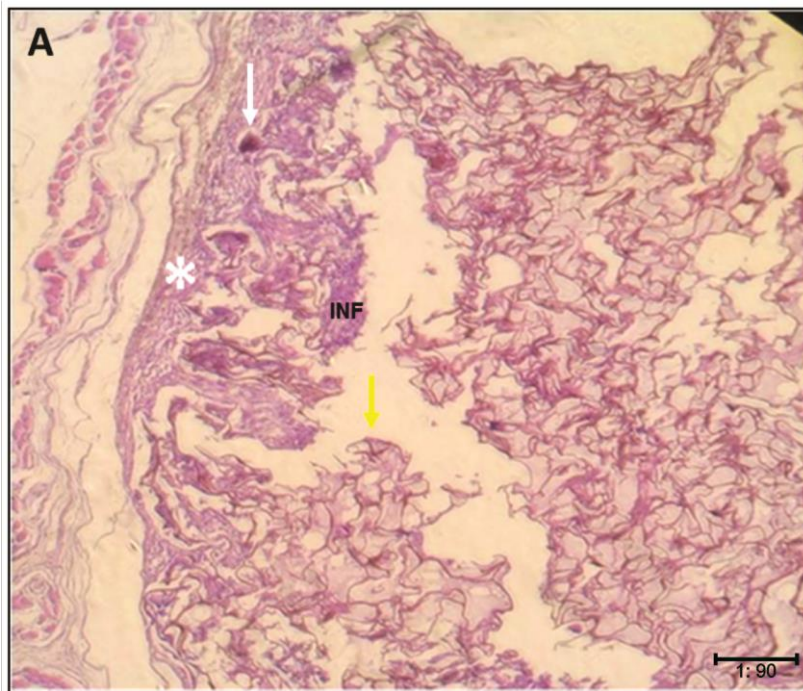
Os cortes histológicos avaliados de matriz 3D não colonizada por ADSC demonstraram a migração do infiltrado, entremeando as fibras da matriz, da periferia para o centro do implante, aumentando de intensidade ao longo do período analisado *in vivo*. Após a 1ª semana de implante, a matriz ainda continha inúmeros espaços vazios (Figura 28A) que foram preenchidos por células inflamatórias ao longo das semanas subsequentes (Figura 28B/C). Células gigantes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção da matriz 3D, foram visualizadas já a partir da 1ª semana após a cirurgia (Figura 28A). Essas células com característica reabsortiva estavam presentes nas semanas subsequentes e estavam sempre associadas às fibras da matriz (Figura 28B/C). Além disso, foi possível observar a formação de novos vasos (neovascularização) a partir da 3ª semana após o implante, sendo visualizados na semana subsequente (5ª). Esse aumento atingiu níveis de 50% superior à 1ª semana. A vascularização, requisito fundamental para o sucesso da Engenharia de Tecido, foi quantificada e compilada em um gráfico (Gráfico 10A).

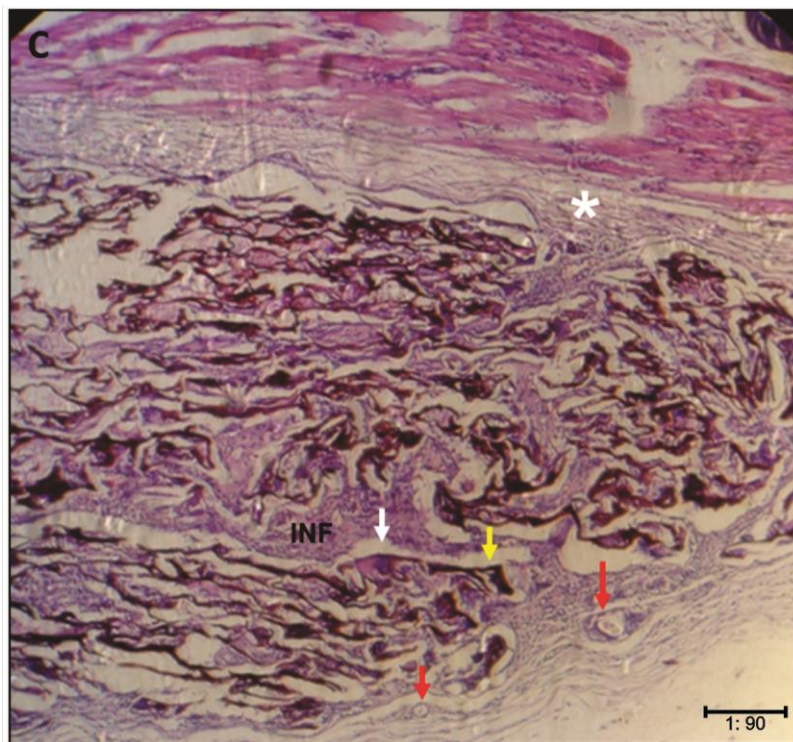
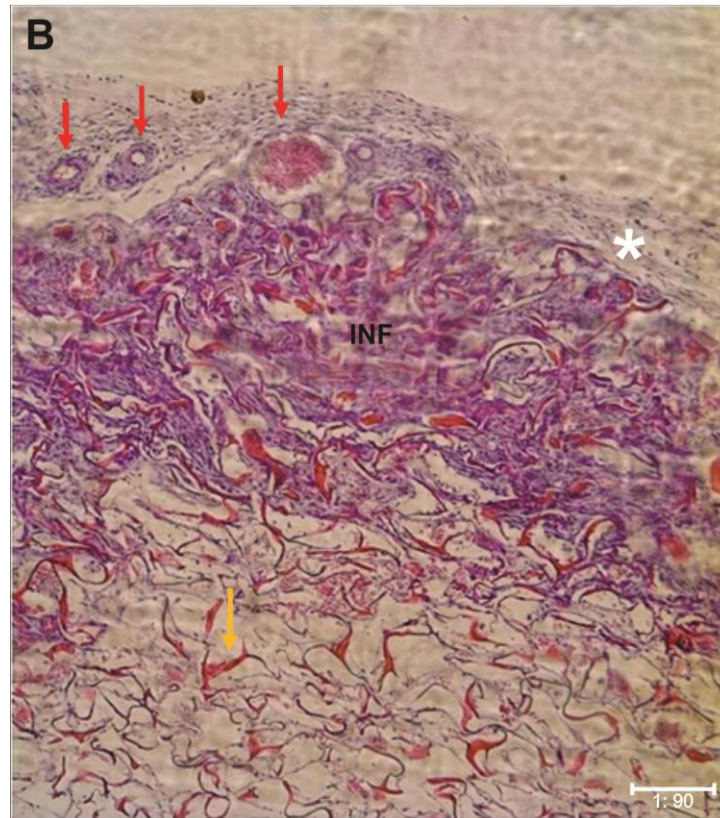
Nas análises provenientes do implante de matriz colonizada por ADSC pode-se observar um infiltrado celular mais intenso (Figura 29) quando comparada à mesma



matriz não colonizada (Figura 28). Sugere-se que o número celular aumentado sejam células-tronco mesenquimais associadas às células inflamatórias. Células gigantes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção da matriz 3D, foram visualizadas já a partir da 1ª semana de implante, como em matriz não colonizada. Entretanto, a neovascularização em matrizes com ADSC ocorreu mais precocemente quando comparadas ao grupo de matrizes não colonizadas. Na presença de ADSC, foi possível notar neovascularização a partir da 1ª semana de implante (Figura 29A). Esses vasos ainda tiveram um aumento mais expressivo nas semanas subsequentes atingindo níveis 3 vezes superiores em relação à 1ª (Gráfico 10B).

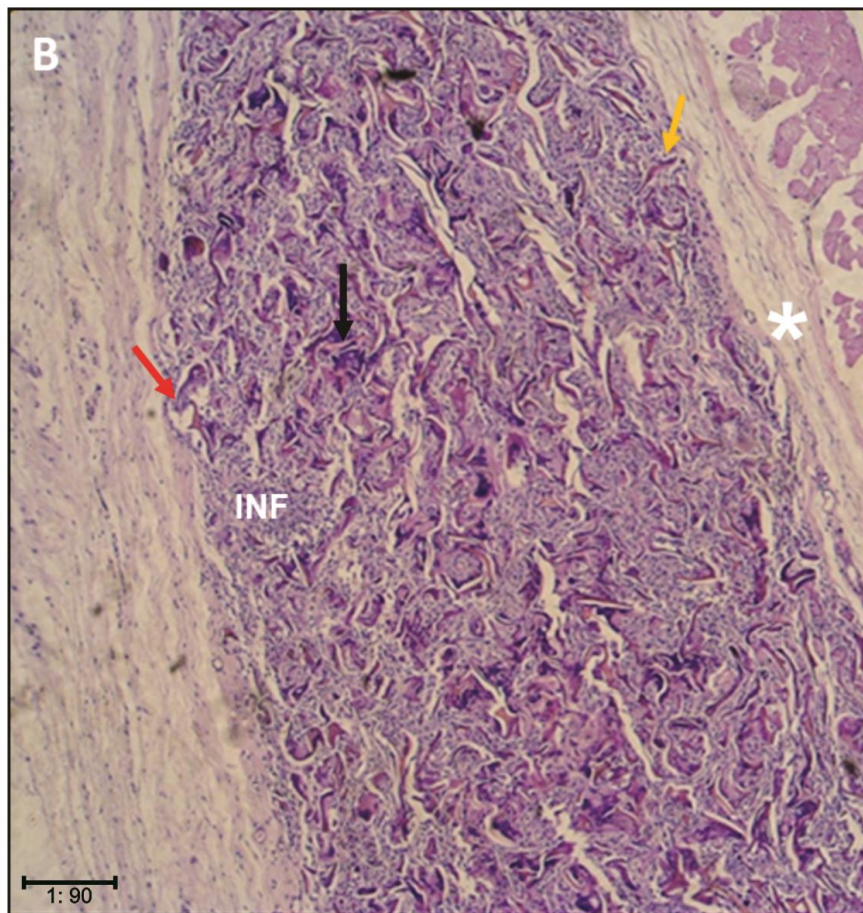
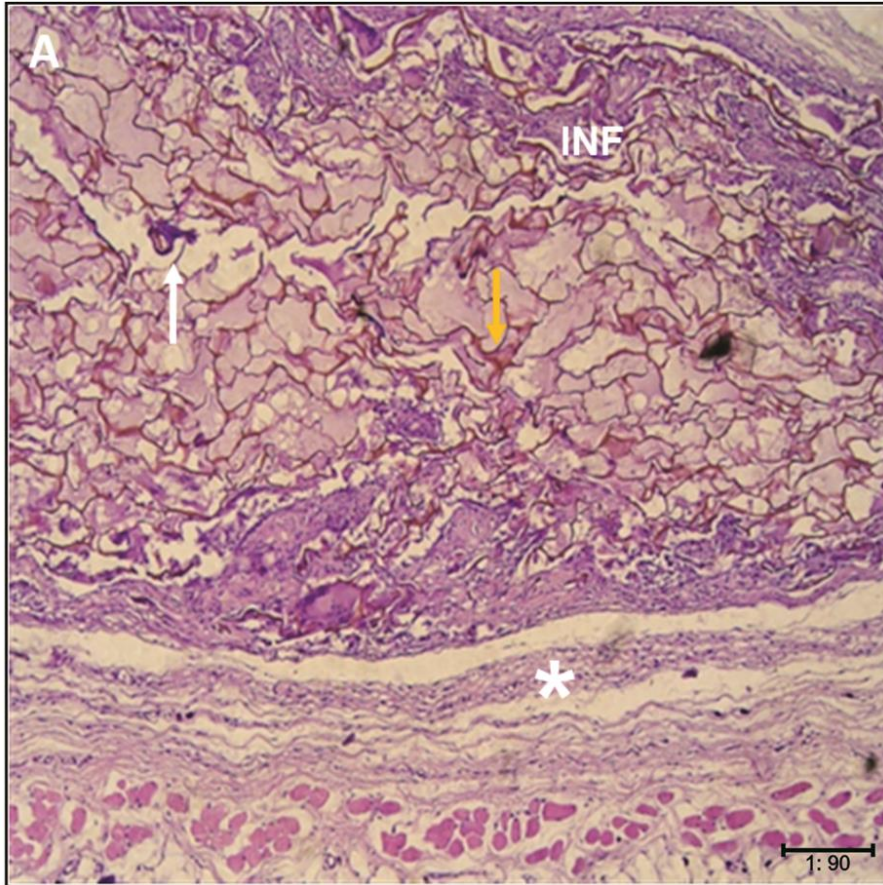
Esses fatos sugerem que ADSC modificam o ambiente onde estão inseridas estimulando a angiogênese e otimizando a reabsorção da matriz porosa.

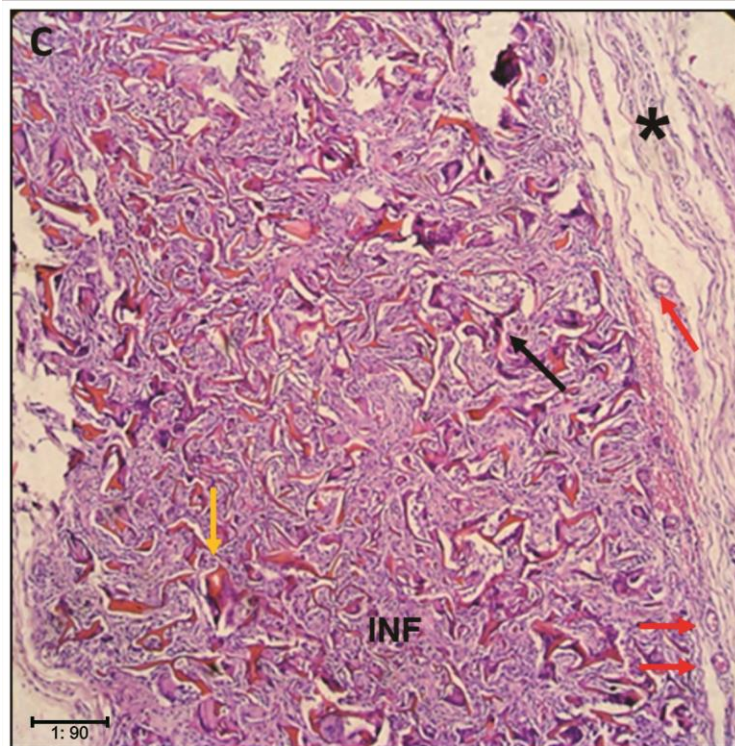




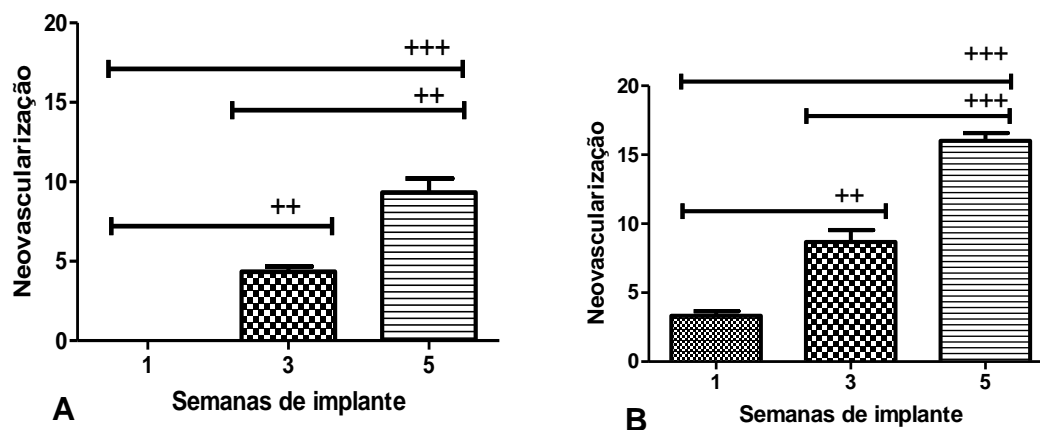
**Figura 28:** Análise histológica dos implantes subcutâneos. Micrografias de cortes histológicos de implantes de matriz 3D não colonizada. Hematoxilina-Eosina. A) Corte histológico referente a 1 semana após implante (aumento 40x) B) Corte histológico referente a 3 semana após implante (aumento 150x). C) Corte histológico referente a 5 semana após implante (aumento 150x). Legenda: Fibras da matriz 3D (setas laranjas); Nevascularização (setas vermelhas); Células Gigantes Multinucleadas (setas brancas); (\*)Fibroplasia; INF: Infiltrado inflamatório.







**Figura 29:** Análise histológica dos implantes subcutâneos. Micrografias de cortes histológicos de implantes de matriz 3D colonizada com ASC indiferenciadas. Hematoxilina-Eosina. A) Corte histológico referente a 1 semana após implante (aumento 90x). B) Corte histológico referente a 3 semana após implante (aumento 90x). C) Corte histológico referente a 5 semana após implante (aumento 150x). Legenda:; Fibras da matriz 3D (setas laranjas); Neovascularização (setas vermelhas); Células Gigantes Multinucleadas (setas brancas); (\*)Fibroplasia; INF: Infiltrado inflamatório.



**Gráfico 10:** Quantificação de neovascularização após implantes subcutâneos de matriz 3D não colonizada (A) e colonizada com ADSC (B). \*\* $p < 0.05$  comparação entre grupos; \*\*\* $p < 0.0001$  comparação entre grupos.



### 6.3.2 Implantes em lesões de calvárias

Nessa pesquisa, todos os animais mantiveram-se com excelente saúde durante todo o transcorrer do período experimental, mesmo nos dias subsequentes aos procedimentos pós-operatórios. Em nenhum dos casos foi necessário a utilização de medicamento tipo antibiótico ou anti-inflamatório no período pós-cirúrgico de recuperação. Foram analisados dois grupos: animais implantados com matriz não colonizada e animais implantados com matrizes colonizadas por ADSC-EGFP. Animais apenas lesionados foram utilizados como controle a fim de verificar reparo ósseo espontâneo. Após 4, 8 e 12 semanas os animais foram eutanasiados e os implantes foram analisados de acordo com a metodologia descrita.

As análises apenas dos defeitos (Figura 30) demonstraram que o tecido ósseo foi realmente lesado. Os animais não sofreram reparo ósseo espontâneo durante todo o período analisado.



**Figura 30:** Resultado histológico dos animais apenas lesionados após 12 semanas. Porção periférica do defeito, mostrando o osso nativo da borda do defeito (seta preta), o espaço da lesão contendo fina membrana de tecido conjuntivo denso (aumento 40x).

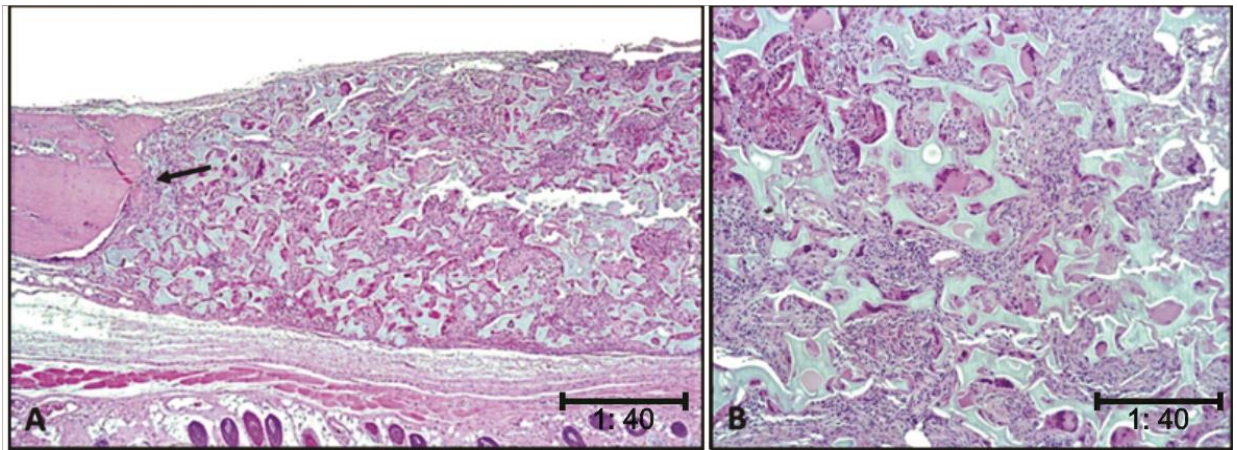
As análises histológicas em animais que receberam matriz 3D não colonizada por ADSC demonstraram que essas matrizes mantiveram-se no local da lesão durante o período analisado. A partir do primeiro período analisado (4 semanas) foi possível notar a presença de infiltrado inflamatório (Figura 31). Esses infiltrado inflamatório permaneceu nas semanas subsequentes e células gigantes mononucleadas, sempre associadas às fibras da matriz, foram visualizadas (Figura 32C e 33B). A partir da 8ª

semanas, a formação de poucos vasos sanguíneos foi visualizada (Figura 32C). Esses vasos mantiveram-se na semana subsequente, entretanto o seu aumento foi sutil (Figuras 33A/B).

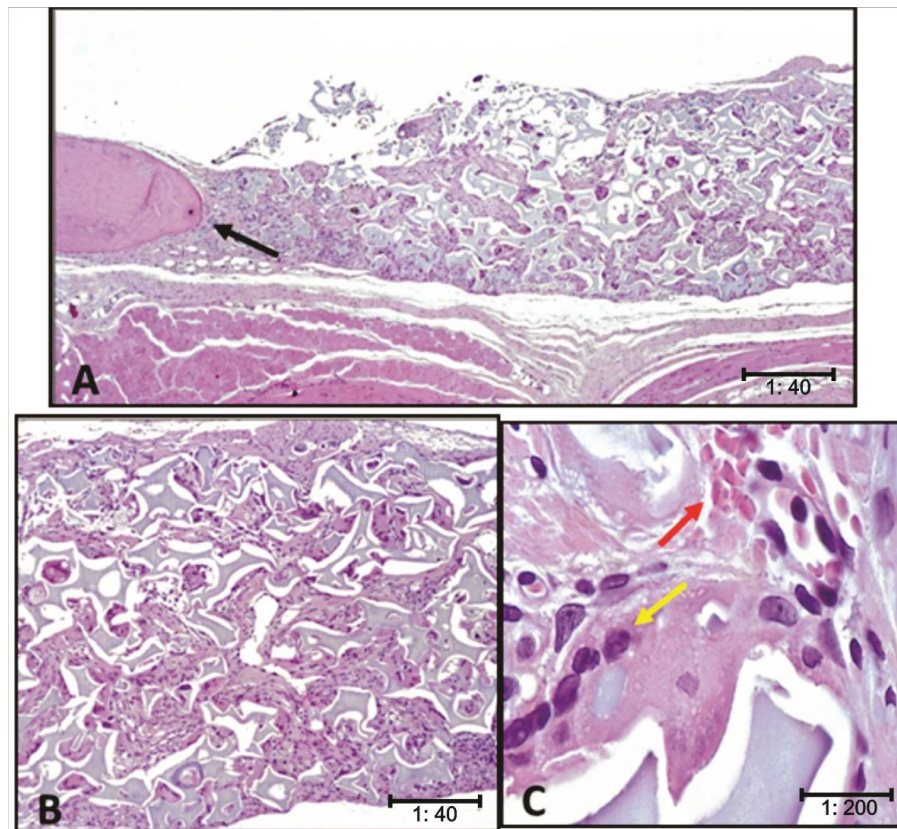
No grupo em que a lesão foi preenchida por matriz 3D colonizada por ADSC, também houve presença de infiltrado inflamatório em todo o período analisado (Figura 34, 35 e 36). Entretanto, esse infiltrado inflamatório estava mais proeminente quando comparado ao grupo anterior. Células gigantes mononucleadas, sempre associadas às fibras da matriz, foram visualizadas (Figura 34B, 36B e 36C).

Já a partir do primeiro período analisado (4ª semana) houve a formação de vasos sanguíneos (Figura 34C). A presença desses vasos ocorreu mais precocemente quando se comparado ao grupo que recebeu apenas matriz não colonizada. Ao longo das semanas subsequentes, houve um aumento no número de capilares visualizados (Figuras 35B, 35C, 36B e 36D). Além disso, a partir da 8ª semana após o implante, foi possível visualizar fibras colágenas maduras (Figuras 35B e 35C). Essas fibras também foram visualizadas na 12ª semana na interface matriz-tecido nativo e ao meio da matriz 3D (Figura 36A e 36C). Fibras colágenas, típicas de formação de tecido ósseo, não foram evidenciadas no grupo que recebeu apenas a matriz 3D não colonizada.

A fim de verificar o comportamento de células-tronco no tecido neo-formado, foi realizado cortes histológicos e imunohistoquímica para EGFP após 4 semanas de implante. O tecido ósseo neo formado, exibiu um caráter mais maduro, com aparência histológica mais organizada e osteócitos ordenados incluídos na matriz óssea recém-formada (Figura 37B) quando comparado ao tecido que recebeu apenas matriz 3D não colonizada (Figura 37A). Além disso, células EGFPs positivas foram visualizadas totalmente inseridas na matriz óssea. Essas células EGFP-positivas estavam totalmente integradas à matriz óssea (Figura 37D). Imunohistoquímica para EGFP em implantes contendo matriz não colonizada foram utilizados como controle negativo da reação (Figura 37C).

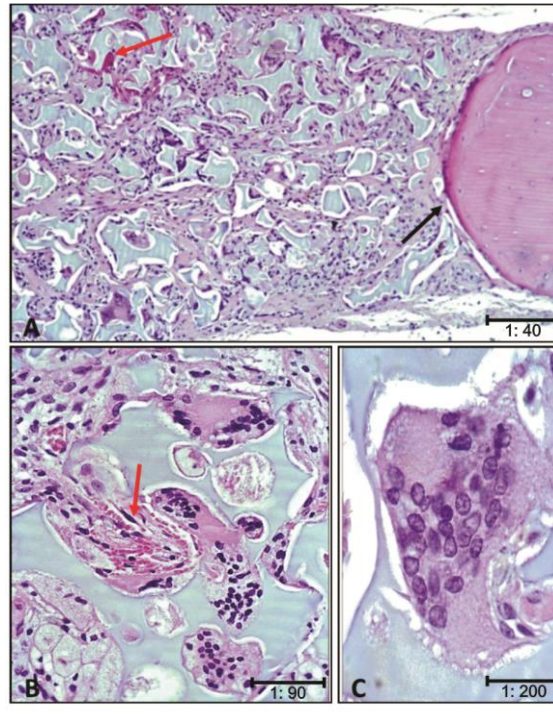


**Figura 31:** Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D não colonizada após 4 semanas de pós-operatório. A. Matriz ao centro do defeito ósseo preenchida por infiltrado inflamatório (Seta preta indica bordas do defeito e tecido nativo do animal) (aumento de 40x). B. Matriz 3D preenchida por infiltrado inflamatório. Presença de células gigantes mononucleadas (aumento 40x).

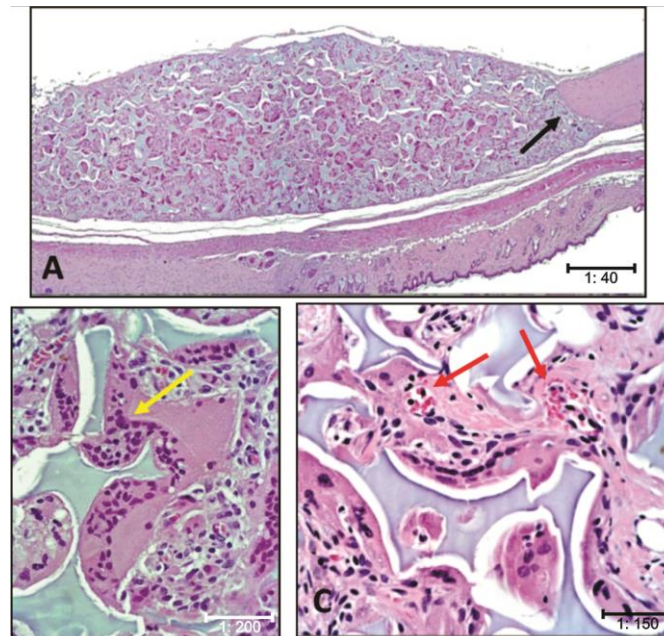


**Figura 32:** Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D não colonizada após 8 semanas de pós-operatório. A. Matriz ao centro do defeito ósseo preenchida por infiltrado inflamatório (Setas preta indica bordas do defeito e tecido nativo do animal) (aumento de 40x). B. Matriz 3D preenchida por infiltrado inflamatório (aumento 40x). C. Presença de células gigantes mononucleadas (seta amarela) e vasos sanguíneos (seta vermelha) (aumento 200x).

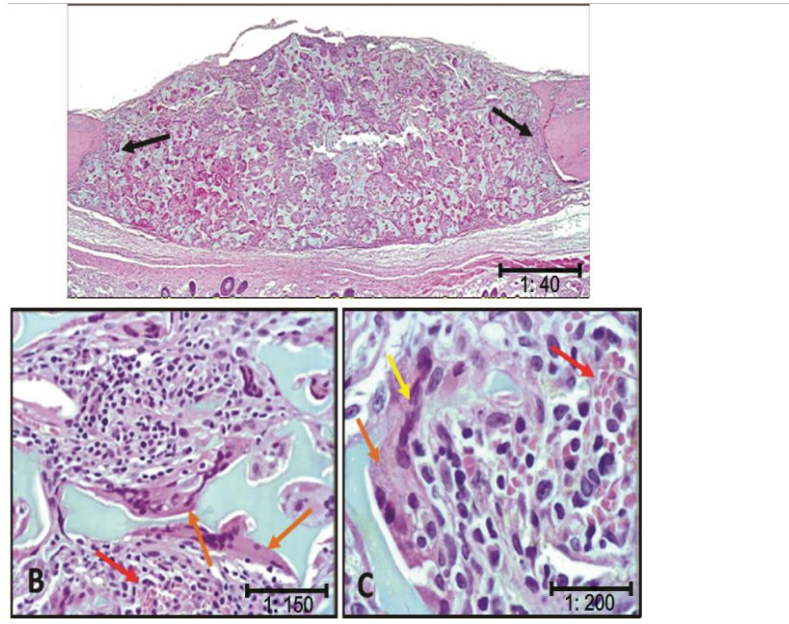




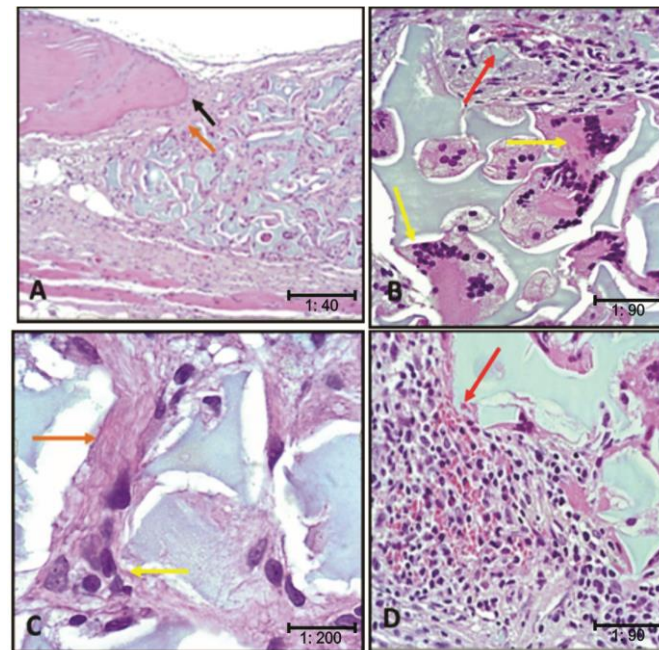
**Figura 33:** Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D não colonizada após 12 semanas de pós-operatório. A. Matriz 3D ao centro do defeito ósseo preenchida por infiltrado inflamatório (setas preta indica bordas do defeito e tecido nativo do animal) e presença de vasos sanguíneos (seta vermelha) (aumento de 40x). B. Visualização de vasos sanguíneos (seta vermelha) (aumento de 90x). C. Presença de células gigantes multinucleadas formadas pela fusão de vários macrófagos (aumento 200x).



**Figura 34:** Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D colonizada por ADSC após 4 semanas de pós-operatório. A. Matriz ao centro do defeito ósseo preenchida por infiltrado inflamatório (Seta preta indica bordas do defeito e tecido nativo do animal) (aumento de 40x). B. Matriz 3D preenchida por infiltrado inflamatório. Presença de células gigantes mononucleadas (seta amarela) (aumento 200x). C. Visualização de vasos sanguíneos (setas vermelhas) (aumento 150x).

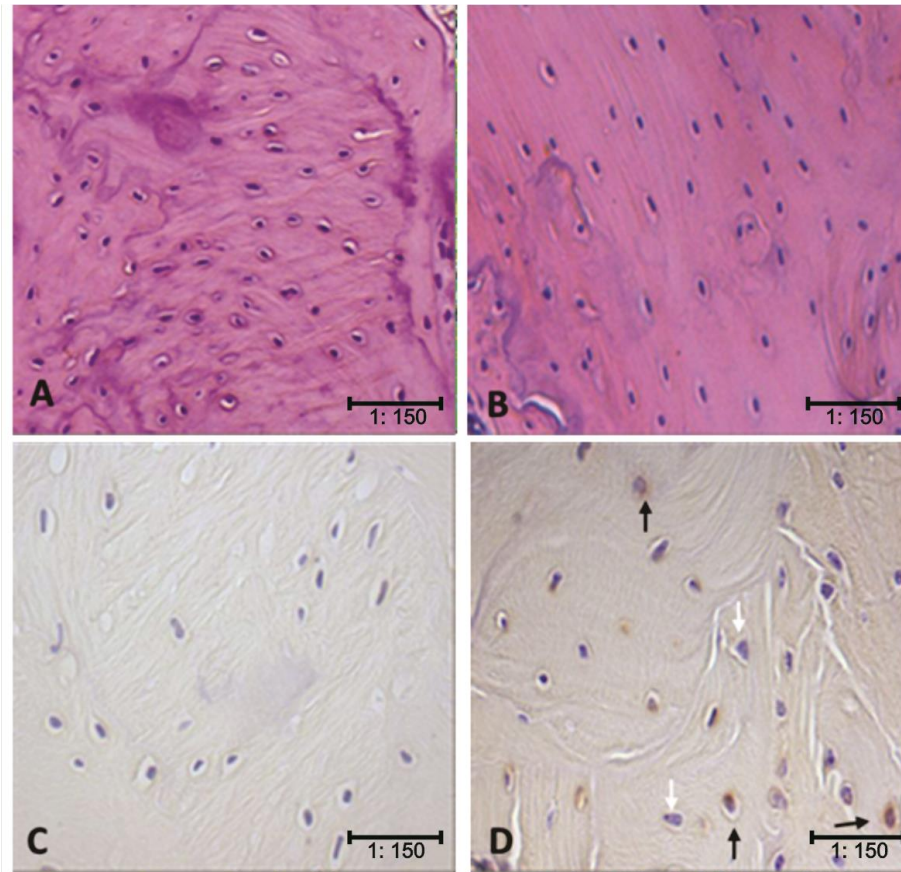


**Figura 35:** Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D colonizada por ADSC após 8 semanas de pós-operatório. A. Matriz ao centro do defeito ósseo preenchida por infiltrado inflamatório (setas pretas indicam bordas do defeito e tecido nativo do animal) (aumento de 40x). B. Matriz 3D preenchida por infiltrado inflamatório. Presença de vasos sanguíneos (seta vermelha) e fibras colágenas (seta laranja) (aumento 150x). Presença de células gigantes (seta amarela), vasos sanguíneos (seta vermelha) e fibras colágenas (seta laranja) (aumento 200x).



**Figura 36:** Cortes histológicos de lesões que sofreram implantação da matriz 3D colonizada por ADSC após 12 semanas de pós-operatório. A. Matriz ao centro do defeito ósseo preenchida por infiltrado inflamatório (seta preta indica bordas do defeito e tecido nativo do animal). Fibras colágenas na interface matriz-tecido nativo (seta laranja) (aumento de 40x). B. Matriz 3D preenchida por infiltrado inflamatório. Presença de células gigantes multinucleadas (seta amarela) e vasos sanguíneos (seta vermelha) (aumento 90x). C. Visualização de células gigantes mononucleadas (seta amarela) e fibras colágenas (seta laranja) (aumento 200x). D. Visualização de vasos sanguíneos entre a matriz 3D (aumento 90x).





**Figura 37:** Análise imunohistoquímica após 4 semanas de implante. A) Fotomicrografias de cortes histológicos de matriz 3D não colonizada. H&E. Visualizar a aparência histológica do osso imaturo; B) Fotomicrografias de cortes histológicos de matriz 3D colonizada por ADSC. H&E. Aspecto histológico do osso cicatrizado, em sua maior parte com aspecto lamelar, osteócitos enfileirados típicos de osso maduro; C) análise imunohistoquímica EGFP após 4 semanas de implante de matrizes 3D não colonizada (controle negativo); D) análise imunohistoquímica EGFP após 4 semanas de implante de matrizes 3D colonizadas por ADSC. Setas pretas indicam a presença de EGFP. Setas brancas indicam osteócitos nativos.



## 7 DISCUSSÃO

Refinamentos nas técnicas de engenharia tecidual ao longo da década passada possibilitaram a regeneração óssea *in vivo* em muitos modelos animais e a transmissão destas técnicas para aplicações ortopédicas (Arosarena & Collins, 2005). Enquanto esses avanços são promissores para uma eventual regeneração óssea, muito ainda precisa ser aprendido sobre a biologia de células progenitoras, interações célula-célula, interações celulares com a matriz extracelular, e mecanismos que envolvam a diferenciação funcional dos tecidos. O presente estudo mostrou o efeito da matriz 3D desenvolvida, à base de quitosana, gelatina e condroitina, sobre a colonização e a diferenciação celular, em uma avaliação *in vitro*, em culturas 3D de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, e *in vivo*, utilizando-se implantes subcutâneos e modelo de lesão de calvária de ratos.

O objetivo da Engenharia de Tecido se baseia na colonização de matriz 3D por células, sendo estas as responsáveis pela síntese da MEC do novo tecido. Portanto, a escolha adequada do tipo celular garante o sucesso dessa tecnologia (Ikada, 2006). Diante do leque das alternativas celulares a serem utilizadas, as células-tronco adultas têm chamado uma grande atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial clínico, que incluem a capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares e capacidade de auto-renovação (Zonari et al., 2012; Conrad et al., 2004; Kassem et al., 2004; Barry & Murphy, 2001; Caplan & Bruder, 2001). A partir dessas características, inúmeras possibilidades de utilização dessas células têm sido demonstradas em terapia celular, terapia gênica e Engenharia de Tecidos. Devido a esses fatores, estudos se nortearam na busca de fontes alternativas de células-tronco.

Em 2001, de forma pioneira, Patricia Zuk e colaboradores descreveram uma população de células derivadas do tecido adiposo humano com características semelhantes às células-tronco extraídas da medula óssea humana, até então a principal fonte desse tipo celular. Tais células possuíam morfologia fibroblastóide, capacidade de diferenciar em condrócitos, adipócitos e osteoblastos e potencial de auto-renovação (Wein et al., 2005; Zuk et al., 2001). Além disso, esses pesquisadores demonstraram vantagens em obter uma quantidade superior dessas células comparada à medula óssea devido à facilidade de obtenção, baixa morbidade e elevado rendimento celular.

Diversos estudos demonstraram serem os processos de digestão enzimática e centrifugação do tecido adiposo adequados para a obtenção de células-tronco

mesenquimais (Zonari et al., 2012; Breyner et al., 2010; Zuk et al., 2001). Entretanto, em nosso trabalho, a concentração enzimática, bem como o tempo de digestão foram superiores àqueles descritos por Zuk, aumentando o rendimento celular. Segundo Aust et al. (2004) e Sen et al. (2001), variações metodológicas podem influir no rendimento de células indiferenciadas do tecido adiposo.

Após os procedimentos descritos na metodologia foram obtidas culturas de células-tronco provenientes do tecido adiposo de ratos que foram purificadas baseando em sua aderência seletiva à superfícies plásticas. Kassem et al. (2004), descrevem que esses tipos celulares são isolados com base em sua aderência seletiva, quando comparada com as células hematopoiéticas, em superfícies plásticas. As células aderidas à placa de cultura são provavelmente MSC, visto que outras células do estroma da medula óssea, tal como adipócitos e células do plasma não aderem tipicamente à placa da cultura (Hui *et al.*, 2005; Alhadlaq & Mao, 2004). Ainda outros autores, como relatam a aderência seletiva de MSC à placa de cultura, o que geralmente não ocorre com demais tipos celulares estromais (Zonari et al. 2012; Breyner et al. 2010; Liu et al., 2006; Hui et al. 2005; Alhadlaq & Mao 2004). Dessa forma, com trocas sequenciais do meio de cultura, células não aderentes foram eliminadas, obtendo-se assim culturas de ADSC homogêneas.

A observação das culturas ao microscópio óptico revelou uma população de células fusiformes, semelhantes a fibroblastos, formadoras de colônias, com capacidade de aderência à superfície plástica da placa de cultivo e com alta capacidade proliferativa. Estes resultados concordam com os descritos na literatura que caracterizam ADSC com morfologia fibroblástica, formadoras de colônias com aderência à superfícies plásticas (Breyner et al., 2010; Machado et al., 2007; Fujimura et al., 2005; Kassen et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Zuk et al., 2002). É importante ressaltar ainda que até a quarta passagem estas células mantiveram seu fenótipo estável e com alta taxa proliferativa. Segundo Zuk (2001), a proliferação dessas células, *in vitro*, se deve à presença de soro fetal. Em meio de cultura basal (DMEM + 10% de soro fetal bovino) essas células foram capazes de se proliferar de forma a permitir a expansão da cultura, sendo mantidas em cultivo até no máximo a 4ª passagem sem apresentar sinais de senescência celular.

Além da caracterização morfológica, foi estabelecida uma caracterização fenotípica quantitativa e qualitativa para identificar a população de células-tronco, através da combinação da expressão de marcadores de superfície. Para essa

caracterização, o presente estudo seguiu os critérios estabelecidos por Zuk (2001 e 2002) e atualmente padronizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, que definem como marcadores de células-tronco mesenquimais as moléculas de superfície CD 54, CD73 e CD90, mas não CD 45, típico de células-tronco hematopoiéticas. Tanto os ensaios de citometria de fluxo quanto de imunofluorescência demonstraram que ADSC constituíam, *in vitro*, uma população homogênea de células que expressam os marcadores de superfície CD54, CD73 CD90, mas não expressavam CD45. Além disso, ADSC extraídas de animais transgênicos para a proteína GFP marcaram-se positivos para essa proteína.

No laboratório onde esse trabalho foi desenvolvido foi demonstrada a capacidade de diferenciação das células-tronco em linhagem osteogênica (Machado et al., 2007), cardiomiogênica (Carvalho, 2008 – não publicado), condrogênica (Breyner, 2009; Medrado et al., 2006) e neurogênica (Hell, 2008-não publicado). A capacidade das células-tronco de se diferenciar em distintas linhagens celulares é um dos requisitos básicos de caracterização das células-tronco mesenquimais, segundo De Ugarte (2003), Anjos-Afonso (2004), Zuk (2001 e 2002) e Sociedade Internacional de Terapia Celular. Devido aos resultados morfológicos, comportamentais e caracterização fenotípica, a população estudada apresentou predominância de células-tronco mesenquimais capazes de auto-renovação e com potencial de multilinhagem.

Apesar dos bons resultados obtidos apenas na utilização de fatores bioativos para a diferenciação osteogênica de células-tronco, estudos recentes indicam que estas células especializam-se melhor quando cultivadas em matrizes tridimensionais que mimetizem o ambiente tecidual (Miranda et al., 2012; Glowacki et al., 2005; Tuzlakoglu et al., 2004; Xia et al., 2004; Kim et al., 2003; Taravel et al., 1995). Além disso, apenas células não são capazes de formar tecidos funcionais. É necessária uma matriz que funcione como suporte para colonização e otimização da diferenciação de células-tronco, além de permitir um crescimento celular ordenado (Cancedda et al., 2003).

Entre todos os biomateriais disponíveis, matrizes poliméricas são particularmente interessantes uma vez que podem ser reabsorvidas e permitem a remodelação do tecido adjacente. A quitosana é um dos biopolímeros promissores para a engenharia de tecidos e possivelmente para a aplicação na regeneração óssea (Di Martino et al., 2005; Huang et al., 2005). A gelatina, por sua vez, foi associada à quitosana para melhorar a adesão celular ancoragem, tração para a migração e

proliferação celular na cultura 3D, propriedades extensivamente reportadas na literatura e atribuídas ao domínio RGD (Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010; Yang et al., 2001; Huang et al., 2005; Lawrence e Madihally, 2008). Já a condroitina, a condroitina é a principal glicosaminoglicana do osso e, em associação com as fibras de colágeno, promove a mineralização *in vitro* (Machado et al., 2007; Bouvier et al., 1996).

Durante o processo de fabricação da matriz o agente ligante é indispensável para providenciar resistência mecânica e, conseqüentemente, a manutenção da estrutura. Embora a adição de agentes ligantes melhore as propriedades mecânicas do material, os componentes empregados para a construção do biomaterial possuem propriedades físicas intrínsecas que também podem alterar o comportamento da matriz. A partir do ensaio de degradação hidrolítica foi observado que a composição da matriz tem grande influência em suas propriedades mecânicas. As matrizes confeccionadas no presente estudo apresentaram sutil taxa de degradação. Matrizes estudadas por Huang (2005) apresentaram uma taxa de degradação muito rápida. Entretanto, nossas matrizes continham uma quantidade menor de gelatina quando comparadas as matrizes dos autores supracitados. O aumento da quantidade de quitosana no material diminui a taxa de degradação da matriz (Chang & Lin, 2007). Essa lenta degradação é ideal para a Engenharia de Tecidos, uma vez que a proposta dessa área é permitir que o tecido nativo, juntamente com as células implantadas, secrete nova MEC. Assim, a meia vida do biomaterial deve ser suficiente longa a fim de permitir o reparo tecidual.

Para se obter um melhor entendimento sobre o tipo de ligações formadas através do agente reticulante, as matrizes teriam que ser avaliadas por microscopia de força atômica. Quando comparamos o valor do módulo elástico das matrizes obtidas com as dos tecidos ósseos humanos, 18600 MPa para o osso cortical e 14800 MPa para os ossos trabeculares (Ashman & Turner, 1993), podemos constatar que as matrizes e compósitos por nós formuladas são muito menos resistentes à compressão. Entretanto, o material desenvolvido é facilmente moldável e, como material de preenchimento para ossos osteoporóticos, apresenta-se como um bom candidato. Embora as matrizes poliméricas tenham a capacidade de conferir ductibilidade e flexibilidade, propriedades necessárias aos materiais para a substituição de tecidos duros, elas têm um módulo de elasticidade muito mais baixo que o do osso natural (Fujikawa & Abe, 1999). Matrizes poliméricas, ao contrário de próteses metálicas, podem ser reabsorvidas e permitem a remodelação do tecido adjacente. Além disso, estas matrizes podem incorporar moléculas biologicamente ativas, fatores de crescimento, antibióticos ou analgésicos,

permitindo não só uma recuperação mais rápida do paciente, mas também uma fixação mais estável do implante ao osso, reduzindo o período de convalescência pós-operatório.

Além da composição da matriz, a sua porosidade tem grande influência sobre a diferenciação celular (Vieth et al., 2007). Mikos propôs, na década de 90, que a taxa de penetração e crescimento celular em suportes porosos está diretamente relacionada ao tamanho e distribuição dos poros no material. Através de uma superfície adequada o material promove a adesão celular, enquanto a existência de poros interconectados permite a migração, crescimento das células no interior da matriz e a neovascularização (Choi et al., 2009; Vieth et al., 2007).

Inúmeros estudos descrevem que é possível obter uma matriz 3D altamente porosa através do gradiente de temperatura seguido de liofilização (Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010; Vieth et al., 2007; Machado et al., 2007; Mao et al., 2003; Oréfice et al., 2006). Seguindo a literatura, nossos resultados mostraram uma microestrutura altamente porosa e com poros interconectados, como confirmado pela microscopia eletrônica de varredura. A porosidade e a estrutura aberta de poros são propriedades desejáveis para biomateriais empregados na engenharia tecidual, pois permite o ingresso de células, a difusão de nutrientes e desempenham um papel fundamental na adesão e proliferação celular (Mao et al., 2003; Lawrence e Madhally, 2008). Esses poros devem ter tamanhos superiores a 150µm a fim de permitir a colonização celular (Choi et al., 2009). Os poros das matrizes sintetizadas nesse estudo tinham poros variando de 50 a 500µm. De fato, ADSC foram observadas em íntimo contato com a matriz 3D, estabelecendo numerosos pontos de adesão via prolongamentos filopodiais com a superfície da matriz 3D já no terceiro dia de cultura. Essas células se apresentavam aderidas à matriz isoladas ou em grupos. Adesão celular similar foi descrita por Malafaya et al. (2005), em matrizes de quitosana semeados com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. Entretanto, tais achados ocorreram somente após 2 semanas de cultura. A adesão precoce das ADSC foi um diferencial importante do nosso estudo, pois a adesão é um pré-requisito fundamental para a secreção de matriz por osteoblastos, que são células dependentes de ancoragem (Mello et al., 2007). Além disso, os múltiplos e bem desenvolvidos sítios de adesão focal induzem as células a passar da fase de proliferação e iniciar uma diferenciação precoce (Bacakova et al., 2004).

Outro aspecto extremamente positivo no cultivo tridimensional é a capacidade em promover interação célula-célula. A conexão intercelular é fundamental para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Assim, o biomaterial deve ser capaz de permitir a conexão células-matriz e célula-célula (Bhatia, 2010; Li et al., 2010; Tabata, 2009; Bacakova, 2004; Cancedda et al., 2003; Holmes, 2002). É bem aceito que o termo biocompatibilidade não é definido apenas pela falta de citotoxicidade do material, mas também por sua biofuncionalidade, o que lhe permite suportar as interações entre as células e a matriz, além de desempenhar a função específica do local onde o constructo será aplicado (Williams, 2008). Como observado por nossos resultados de através de MEV e cortes morfológicos, as células-tronco foram capazes de estabelecer interconexões celulares, entre células isoladas, distantes umas das outras ou em grupos próximos.

De acordo com os objetivos do presente trabalho e a fim de comprovar o potencial osteogênico de ADSC e a influência da matriz porosa, essas células foram cultivadas tanto em monocamada quanto em matriz 3D e submetidas a ensaios determinantes. Para monitorar e evidenciar o efeito da matriz no crescimento e diferenciação das células-tronco, culturas 2D foram utilizadas como referência.

Em 2001 Zuk e colaboradores, demonstraram que, *in vitro*, células indiferenciadas provenientes do produto de lipoaspiração eram capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica na presença de dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato e vitamina C. Assim, o meio de indução osteogênico utilizado neste estudo seguiu o proposto por esses autores.

Após uma semana da adição do meio de indução osteogênica, foi observada uma mudança na morfologia das células de ambos os tipos de cultura. A morfologia inicial fusiforme deu lugar a um formato cubóide. De acordo com a literatura, esta mudança morfológica é característica do processo de diferenciação osteogênica (Long, 2001), visto que os osteoblastos apresentam formato cubóide (Gomide et al., 2011). Huang et al. (2002), em trabalho de diferenciação de células-tronco humanas provenientes do tecido adiposo, relataram que apenas as células induzidas com meio osteogênico alteravam seu formato fusiforme assumindo formato cuboidal. Outros estudos de diferenciação osteogênica utilizando células-tronco provenientes de tecido adiposo de camundongos (Ogawa et al. 2004) e ratos (Miranda et al., 2011) relataram as mesmas observações encontradas no presente estudo, além de mencionarem que estas foram notadas também após sete dias de indução. Assim, podemos inferir que o meio

osteogênico proposto por Zuk et al. (2001), foi eficaz na indução osteogênica do tipo celular utilizados neste estudo.

A partir da primeira semana após a indução osteogênica, foi possível a observação de estruturas de coloração clara, semelhantes a ilhotas que se formavam em torno de grupos celulares, a matriz óssea. Estudos prévios que pesquisaram a obtenção de linhagens osteogênicas a partir de tecido adiposo (Huang et al., 2002; Zuk et al., 2002; Hattori et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Sugiura et al., 2004) ou medula óssea (Machado et al., 2007) relatam a formação desta mesma estrutura. Ainda, após duas semanas da adição de meio indutor de osteogênese puderam ser observadas, formações mineralizadas semelhantes às aquelas descritas por outros autores como nódulos ósseos. Esses Fridesnstein (1990) documentaram a capacidade osteogênica *in vitro* e *in vivo* de células-tronco de roedores. Quando cultivadas em condições que permitam a mineralização, as colônias eram avaliadas pela formação de “nódulos ósseos”.

A produção de matriz mineralizada é considerada como um marcador diferenciação de MSC em linhagem osteoblástica (Wiesmann et al., 2006). Para identificação de estruturas mineralizadas, processos de coloração dos tipos Von Kossa e Tetraciclina foram realizados. Tanto culturas bi quanto tridimensionais coraram-se positivamente para ambas as colorações. Diversos autores (Sugiura et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Hattori et al., 2004; Huang et al., 2002; Zuk et al., 2002) relatam na literatura a positividade de formação de estruturas mineralizadas, indicadoras de células de linhagem osteogênica, bem como de suas precursoras, para Von Kossa e Tetraciclina.

A análise da biocompatibilidade de matrizes estruturais produzidas a partir de biomateriais é realizada por métodos baseados na avaliação da citotoxicidade (Su et al., 2009), da mutagênese (Wang et al., 1997; Montanaro, Cervellati et al., 2006) e da biofuncionalidade celular (White et al., 2009). Para a avaliação da citotoxicidade, o ensaio de MTT é o mais aplicado, sendo um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade e proliferação celular (Bhardwaj et al., 2008). Esse ensaio é realizado para avaliação da biocompatibilidade de vários tipos de biomateriais, utilizando diferentes tipos de linhagens celulares (Pereira et al., 2004; Serrano, Portoles et al., 2008; Su et al., 2009).

Quando cultivadas em sistema bidimensional, ADSC reduziram a taxa de formação de cristais de formazam na 3ª semana de cultivo. Já em matrizes 3D é possível notar um aumento de cerca de 20% na taxa de formação de cristais de formazam a partir

da 2ª semana. Esses resultados estão de acordo com a literatura que descrevem um aumento na proliferação e viabilidade celular em culturas tridimensionais (Zonari et al., 2012; Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010).

O declínio da metabolização do MTT em culturas de monocamada pode ser explicado por apoptose, uma vez que processo de morte celular acompanha a diferenciação, pois células que não são capazes de se diferenciar entram em apoptose (Vaux and Korsmeyer, 1999; Meier, Finch and Evan, 2000). Esse comportamento não foi visualizado em culturas tridimensionais. Os parâmetros arquitetônicos, tais como porosidade, tamanho dos poros e interconectividade, são relatada como um dos fatores determinantes na indução da proliferação e sobrevivência celular (Wu & Ding, 2004; Rose e Oreffo, 2002). Ng et al., (2005) e Cancedda et al., (2003) descrevem que a adesão das células à matriz é importante para a manutenção da proliferação e viabilidade celulares.

Além disso, o colágeno apresenta seqüências de aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD), envolvidas com a adesão celular promovendo ancoragem, tração para a migração e proliferação celular (Huang et al., 2005; Yang et al., 2004). Assim, os dados obtidos com esse ensaio, sugerem que o biomaterial não possui efeito citotóxico e foi capaz de promover uma ativação celular intensa, uma vez que houve, não só a manutenção, quanto o aumento da viabilidade celular, quando cultivadas em matriz 3D. Esses resultados estão de acordo com diversos autores que relatam a melhor manutenção da viabilidade celular quando cultivadas em sistema tridimensional (Di Martino et al., 2005; Huang et al., 2005; Donati et al., 2004; Francis Suh et al., 2000).

Diferenciação osteogênica de MSC, a qual pode ser induzida pela adição de dexametasona,  $\beta$ -glicerolfosfato e ácido ascórbico, é monitorada pela produção de fosfatase alcalina e colágeno e expressão de osteocalcina (Coelho et al., 2000). Tanto em cultivo de monocamada quanto em matriz 3D, ocorreu um aumento da atividade da enzima fosfatase alcalina. A enzima fosfatase alcalina está expressa em ossos, fígado, placenta e intestino. Células-tronco e germinativas também expressam essa enzima em níveis basais (Huang et al., 2005). Esta enzima participa do processo de mineralização de tecido ósseo em formação (Machado et al., 2007; Hung et al., 2002), sendo sua expressão correlacionada com a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos (Harris, 1989). Além disso, enzima fosfatase alcalina e o ácido de Schiff reagem fortemente com os osteoblastos (Zuk et al., 2002; Fawcett, 1975). Portanto, o aumento da atividade desta enzima é um indicativo da alteração fenotípica sofrida pelas células quando



cultivadas em meio indutor osteogênico. Apesar do aumento da atividade da FA tanto em sistema 2D quanto 3D, nossos resultados demonstram que, para ambos os meios utilizados e em todos os períodos avaliados, os níveis de fofatase alcalina foram superiores em culturas 3D em relação às 2D. As interações mecânicas e físicas das células com a matriz são tão importantes quanto os fatores solúveis na promoção da proliferação, diferenciação e expressão gênica (Chen et al., 2004). Já foi demonstrado que a condroitina não só aumenta a proliferação das células em contato com a zona de mineralização (Moreira et al., 2004), como também estimula a produção de fosfatase alcalina pelas mesmas (Wollenweber et al., 2006). Visto que ADSC quando cultivadas em matriz 3D exibiram, além de uma maior reação à fosfatase alcalina, a manutenção de níveis elevados durante todo o período de cultivo, podemos inferir que a matriz suporte mimetizou bem o ambiente ósseo *in vivo*, estimulando a diferenciação osteogênica das células-tronco.

Outro ensaio realizado e que corrobora com a hipótese da melhor estimulação osteogênica de ADSC em matriz 3D, é a dosagem da produção de colágeno uma vez que segundo Long et al. (2011) essa proteína se apresenta em abundância na matriz extracelular óssea.

Os resultados obtidos com esse ensaio demonstraram que, quando cultivadas em monocamada, a produção de colágeno por ADSC adquire níveis cerca de 50% superiores em relação ao controle a partir da 2ª semana de cultivo. Já em cultura 3D, esse mesmo grupo celular apresentou precocemente aumento da produção de colágeno, a partir da 1ª semana de cultivo. Comparando as culturas 2D e 3D é possível perceber um aumento significativo da produção de colágeno em matriz 3D. Mais uma vez, os resultados sugerem uma osteogênese de ADSC mais eficiente quando cultivadas em sistema 3D, uma vez que células da linhagem osteogênica são sabidamente produtoras de altas quantidades de colágeno (Gun *et al.*, 2005). Esses resultados concordam com diversos autores (Zonari et al., 2012; Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010; Machado et al., 2007; Tanaka et al., 2005) que obtiveram o aumento da produção de colágeno por ADSC cultivadas em matriz tridimensional, quando comparada ao sistema 2D.

A fim de confirmar o comprometimento das culturas celulares com a linhagem osteogênica e avaliar o estágio de diferenciação em que as células se encontravam, a expressão de proteínas como osteopontina e osteocalcina, foi avaliada. Após 21 dias em meio de indução osteogênico a expressão de ambas as proteínas foram detectadas tanto

em cultivo 2D quanto em cultivo 3D. A osteopontina, além de ser um marcador da osteogênese, media interações célula-célula e célula-matriz. Um dos ligantes para a osteopontina é o CD44, a sua ligação promove a transdução de sinais de sobrevivência para a célula. Machado e colaboradores (2007) relatam a expressão de OP em células-tronco humanas em meio basal e em meio osteogênico. Nossos resultados concordam parcialmente com os autores supracitados, uma vez que a OP foi detectada apenas em células submetidas à indução osteogênica. A expressão de OP é fortemente evidenciada em culturas 3D. Denhardt et al. (2001) relata que o estímulo mecânico estimula a expressão de OP. A OP é expressa nos estágios iniciais da diferenciação e é mantida em alto nível até os estágios avançados de mineralização *in vitro*. A síntese de OP no osso ocorre quando os osteoblastos estão formando ossos novos, mas não em processos adaptativos de remodelamento ósseo (Denhardt et al., 2001).

A osteocalcina é uma proteína produzida pelos osteoblastos durante a fase de mineralização da matriz e é a proteína não colagenosa mais abundante incorporada na matriz óssea (Fottrell and Power, 1991). Zuk e colaboradores (2001) relatam que células-tronco obtidas de tecido adiposo quando expostas à dexametasona não expressam osteocalcina em nenhum dos estágios após a indução osteogênica. Nossos relatos não estão de acordo com os de Zuk, uma vez que células-tronco submetidas à indução osteogênica expressaram OC após 21 dias. Machado e colaboradores (2007) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, uma vez que detectaram expressão de OC em células-tronco induzidas à osteogênese tanto em sistema 2D quanto em matriz 3D de quitosana e gelatina. A expressão de osteocalcina indica uma maturação de osteoblastos, uma vez que essa proteína é expressa pouco antes da mineralização (Lacke et al., 2006). OC é considerado um marcador tardio da diferenciação osteogênica e sua função tem sido associada a estabelecer o estado diferenciado de osteoblastos (Lacke et al., 2006).

Há evidências de que células-tronco alteram o seu padrão de expressão de proteínas de superfície, dependendo do tempo de cultura e da indução à diferenciação. Essa alteração está relacionada à diferenciação celular (Breyner et al., 2010; Wiesmann et al., 2006). Assim, 30 dias após a indução osteogênica uma nova análise fenotípica foi realizada. Tanto nos ensaios de citometria de fluxo quanto na imunofluorescência, as células-tronco mantiveram seu padrão de expressão de CD54 e CD73, entretanto a expressão de CD90 foi interrompida. CD90 é uma proteína de membrana de 25–30 kDa a qual é comumente usada como marcador positivo para MSC. A função biológica precisa de CD90 ainda não está clara, mas tem sido descrito como um marcador para a

diferenciação osteoblástica, uma vez que esse marcador tem sua expressão interrompida em osteoblastos maduros (Wiesmann et al., 2006; Chen et al., 1999). Os nossos resultados corroboram com aqueles obtidos por Wiesmann e colaboradores (2006) e Chen (1999) que relatam o declínio da expressão de CD90 após a indução osteogênica em células-tronco.

Os resultados das análises morfológicas, bioquímicas e gênicas demonstraram que células-tronco de tecido adiposo se comprometeram na linhagem osteogênica. Além disso, as observações demonstram que a manutenção da viabilidade e proliferação celular, bem como o processo osteogênico, são mais bem eficientes em cultivos 3D. Segundo Alves da Silva (2009), a porosidade influencia não só nas características mecânicas da matriz, mas também na capacidade de diferenciação e manutenção do fenótipo celular. Essa sinalização, como mesmo descreve a literatura, foi adquirida graças à superfície adequada do material. A presença de quitosana e gelatina promoveram o contato célula-matriz, que, segundo vários autores, promovem a ativação celular, a qual resulta em adesão e aumento da proliferação celular (Gomide et al., 2012; Zonari et al., 2012; Miranda et al., 2011; Breyner et al., 2010; Huang et al., 2005, Donati, et al., 2004, Di Martino, et al., 2005, Francis Suh, et al., 2000). A condroitina mimetiza o tecido ósseo *in vivo* e estimula a diferenciação osteogênica das MSC (Wollenweber et al., 2006; Moreira et al., 2004). Já a existência de poros interconectados permite a migração e o crescimento das células no interior da matriz. Essa intercomunicação permite ainda a passagem de nutriente e a interconectividade entre as células. Como descrito por Arosarena (2005) e Yamane et al., (2005) a geometria formada pela estrutura 3D de quitosana apresenta propriedades mecânicas exigidas pela engenharia de tecido, sobretudo de tecido ósseo, como resistência à compressão, flexibilidade e estabilidade funcional.

Diante do exposto, podemos afirmar que a matriz 3D constituída de quitosana, gelatina e condroitina forneceu sinalização suficiente para a manutenção da viabilidade e proliferação celular, além de induzir a osteogênese *in vitro*.

Um dos principais desafios da Engenharia de Tecido é conciliar as propriedades físico-químicas da matriz 3D com o comportamento biológico celular, visando que estas obtenham uma função desejada no tecido nativo (Thei Han, 2009). Estudos demonstraram que quitosana limita a proliferação celular, apesar da biocompatibilidade, enquanto que a união de quitosana - gelatina aumenta significativamente a afinidade celular e favorece a adesão, proliferação e diferenciação das células. Ainda, segundo

esse mesmo estudo, a quitosana exibe várias atividades biológicas, devido à sua semelhança com glicosaminoglicanos e seus derivados (Thei Han, 2009). Muitos estudos atualmente estão sendo feitos em relação à utilização de biomateriais associados às células-tronco mesenquimais em sítio ectópico (Gomide et al., 2011; Hartman et al., 2004). Assim, o sistema de cultura 3D desenvolvido nesse trabalho foi avaliado através de implantes subcutâneos *in vivo* para avaliar sua biocompatibilidade.

Quando um tecido é lesado para o implante de um material, uma resposta de cicatrização é iniciada por uma série de eventos complexos. As principais etapas desse processo incluem a inflamação aguda, inflamação crônica e a formação de tecido granuloso (Bhardwaj et al., 2008). Durante os primeiros dias da implantação, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o local do implante como resultado do ferimento e da inserção de um material estranho. O recrutamento dessas células caracteriza a inflamação aguda. No entanto, a persistência e o aumento crescente do número de neutrófilos na região do implante está relacionado à liberação de substâncias citotóxicas pelo implante (Wu et al., 2006). Neste trabalho, não foi avaliada a resposta aguda. No entanto, em ambos os grupos e em todos os tempos analisados não se observou a presença de neutrófilos, região de necrose, abscesso ou tumorigênese em nenhuma região próxima ao implante. Além disso, os tecidos adjacentes não sofreram nenhuma alteração morfológica, de forma que essas observações permitem sugerir que a matriz 3D não liberou produtos citotóxicos.

Ao longo dos períodos avaliados, a matriz 3D foi preenchida por infiltrado inflamatório e circundada com uma discreta fibrose. Essas observações indicam uma inflamação crônica, fase que é caracterizada pela presença de um infiltrado de células mononucleares como linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os macrófagos secretam proteínas que induzem a formação de uma cápsula fibrosa em volta do implante. Quando o implante é produzido a partir de um material não reabsorvível, uma cápsula fibrosa espessa é formada ao seu redor. Já implantes derivados de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, apenas uma fina cápsula fibrosa é formada e posteriormente pode ser absorvida (Volova et al., 2004).

Embora os macrófagos secretem proteínas que induzam a formação de uma cápsula fibrosa, também secretam citocinas pró-angiogênicas e mediadores de degradação do biomaterial, importantes para o processo de incorporação do implante no tecido (Rodriguez et al., 2008). A fusão de macrófagos leva à formação de células gigantes, tipo corpo estranho, responsáveis pela fagocitose e reabsorção dos implantes

(Wu et al., 2006). A presença de células gigantes foi observada a partir da primeira semana após o implante em ambos os grupos sendo evidenciada nas demais semanas. Além disso, com o aumento de células rebsortivas em contato com o biomaterial houve uma redução da intensidade das fibras da matriz. Gomide et al. (2012), Lascke et al. (2009) e Picker reyer (2006) obtiveram os mesmos resultados afirmando que a quitosana é biodegradável. Nossos resultados demonstram uma pequena reação tipo corpo estranho, concordando com inúmeros autores que descrevem implantes à base de quitosana produzindo mínimas reações desse tipo (Miranda et al., 2011; Klokkevold et al., 1996; Muzzarelli et al., 1994). Matrizes para a Engenharia de Tecidos devem ser biocompatíveis sem induzirem uma forte reação inflamatória após implante no hospedeiro (Laschke et al., 2009). Dessa forma podemos inferir que a matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina é biocompatível e biodegradável.

Um dos fatores determinantes para o sucesso da Engenharia de Tecidos é a vascularização do implante. Vasos sanguíneos são estruturas constituídas basicamente de uma monocamada de células endoteliais, interconectam para formar tubos que viabilizam o fluxo de sangue e a perfusão tecidual do organismo (Tobelem, 1990). A neovascularização é uma resposta natural e necessária à injúria nos processos de reparação e cicatrização e é um mecanismo de importância considerável em vários processos fisiológicos e patológicos do organismo (Griffioen et al., 2000). Além disso, os vasos sanguíneos são responsáveis pelo suprimento de oxigênio, inibindo a formação de necrose e perda do enxerto, além de favorecer a nutrição das células no interior do enxerto e a dispersão de restos metabólitos para fora do enxerto. Tanto em implantes com matrizes 3D descolonizadas quanto colonizadas por ASDC, foi observada a presença de neovascularização que aumentou ao longo do período analisado. Tais resultados concordam com Choi (2009) e Hoffmann (2009) que afirmam que a porosidade é fator influenciador de neovascularização. Esses mesmos autores relatam que poros com tamanhos superiores a 150µm, como os do presente estudo, permitem a formação de neovascularização *in vivo*. O crescimento de vasos sanguíneos pode ser ativado por uma série de estímulos químicos, metabólicos ou por fatores mecânicos. Os fatores químicos e metabólicos incluem substâncias como heparina (anticoagulante), prostaglandinas (mediador no processo inflamatório), fatores de crescimento, vitaminas e hipóxia (baixa concentração de oxigênio). Os fatores mecânicos estão relacionados com as alterações no fluxo de aportes para formação de vasos (velocidade do fluxo, pressão, ou estresse), com o crescimento do tecido, principalmente durante o

desenvolvimento, com a natureza do substrato no qual as células crescem, ou ainda, podem estar relacionados com o contato celular e as condições no biomaterial utilizado (AIRES, 2008). Em nossos estudos a presença de células-tronco mesenquimais estimulou a formação de novos vasos, uma vez que a neovascularização em matrizes colonizadas ocorreu mais precocemente e com maior quantidade de vasos quando comparadas às matrizes não colonizadas. Esse fenômeno concorda com aqueles obtidos por Gomide e colaboradores (2012) que relatam uma maior neovascularização em matrizes colonizadas por ADSC. Células-tronco secretam fatores angiogênicos, favorecendo a regeneração tecidual (Moioli et al., 2008). Além disso, os vasos sanguíneos são responsáveis pelo suprimento de oxigênio, inibindo a formação de necrose e perda do enxerto, além de favorecer a nutrição das células no interior do enxerto e a dispersão de restos metabólitos para fora dele. Segundo, Choi (2006) uma matriz 3D porosa é uma estrutura adequada não só para adesão celular, como para difusão de nutrientes e metabólitos, além de promover *in vivo* neovascularização.

Visando reparar defeitos em variados sítios ósseos, o padrão ouro da enxertia atualmente consiste na utilização de osso autólogo. Entretanto, na maioria dos casos, a quantidade de tecido ósseo é insuficiente para o reparo (Tabata, 2009; Hui et al., 2005; Salgado et al., 2004). Essa dificuldade tem levado a pesquisa de diversos biomateriais como alternativa no tratamento de lesões ósseas permanentes.

Estudos anteriores de matrizes a base de quitosana enfocaram principalmente a preparação e a caracterização de diferentes blendas do biomaterial (Huang et al., 2005; Yin et al., 2003). Miranda e colaboradores, em 2011, sugerem a utilização de uma matriz de quitosana e gelatina para a reconstrução óssea alveolar. Assim, propusemos um avanço nos experimentos, com a realização dos implantes *in vivo* em um modelo de defeito ósseo de calvária a fim de averiguarmos sua aplicação na Engenharia de Tecido ósseo. Dessa forma, as matrizes colonizadas ou não colonizadas por ADSC após 3 dias de cultura foram utilizados no modelo de defeito crítico de calvária de ratos.

Durante todo o período de cultivo e em ambos os grupos infiltrado inflamatório, com presença de células gigantes foram visualizadas. Essas células gigantes, de caráter reabsortivo, estavam sempre em contato com as fibras da matriz. Assim, a matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina foi progressivamente reabsorvida, com uma taxa de degradação lenta. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Miranda et al. (2011) que descrevem uma lenta degradação da matriz. A quitosana é degradada *in vivo* por hidrólise catalisada por lisozima e é decomposta em oligossacarídeos (Liu et

al., 2007). Um biomaterial ideal deve ser biodegradável a fim de se obter a deposição de novo osso regenerado (Ge et al., 2008). Além disso, segundo Ucelli (2008), as células-tronco mesenquimais podem interagir com ambos componentes dos sistemas imune inato e adaptativo, levando a modulação de várias funções efetoras.

Como em implante subcutâneo, uma intensa presença de vasos sanguíneos em ambos os grupos foi notado. Para a Engenharia de Tecidos a vascularização é particularmente importante, pois favorece a nutrição, excreção de metabólitos e impede a formação de necrose, sendo, portanto, um dos maiores pré-requisitos para a sobrevivência celular por um longo período no interior da matriz (Laschke et al., 2008). Entretanto, a presença de neovascularização ocorreu precocemente e com mais evidência em matriz 3D colonizada por ADSC. Mais uma vez, nossos resultados demonstram que a presença de células-tronco mesenquimais alterou o perfil de formação de novos vasos, estimulando a neovascularização, como confirmado por Mioli e colaboradores (2008).

Além do precoce estímulo angiogênico por matrizes colonizadas por ADSC, a partir de 8 semanas após o implante foi possível notar a presença de fibras colágenas, o que não ocorreu em matrizes não colonizadas. O processo de cicatrização e reparo ósseo inclui a secreção de fibras colágenas orientadas sobre as quais o tecido ósseo maduro é formado (Long et al., 2001).

Quando se trabalha em modelos de implantes, uma grande preocupação é a identificação e a manutenção de uma marcação efetiva das células do organismo doador, para o rastreio do destino dessas células no organismo hospedeiro, por todo o período experimental. Embora a proteína EGFP seja considerada um marcador de escolha para muitos tipos de transplante de células, sabe-se que ela pode perder sua fluorescência direta durante o processamento de tecidos (Swenson et al., 2007). Por esta razão, a imuno- marcação foi realizada a fim de obtermos um rastreamento efetivo dessas células. Nossos resultados demonstram que as células transplantadas migraram e se diferenciaram em osteoblastos e osteócitos nas regiões de lesão tecidual, contribuindo para a regeneração óssea. A imunohistoquímica mostrou células transplantadas, fisiologicamente integradas com os osteócitos nativos (EGFP-negativos), na matriz óssea. Esses resultados revelaram o potencial das matrizes de quitosana, gelatina e condroitina em atuar como carreadoras de células-tronco e a capacidade de diferenciação dessas células na linhagem osteogênica.

Devido às suas características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mimetismo da MEC e possibilidade de permitir a angiogênese, aderência, proliferação e diferenciação celular, a matriz 3D desenvolvida nesse estudo vem de encontro às necessidades da medicina regenerativa, sobretudo na regeneração óssea. A união dos dados obtidos por esse trabalho nos permite vislumbrar a possibilidade de utilização da matriz 3D de quitosana, gelatina e condroitina como um potencial carreador para células-tronco mesenquimais na engenharia de tecido ósseo. Assim, nosso estudo abre uma perspectiva para sua aplicação clínica e para futuros estudos destinados à reconstrução óssea.



## 8. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que as células-tronco derivadas de tecido adiposo são capazes de responder aos estímulos fornecidos *in vitro* e comprometer-se na linhagem osteogênica. A matriz 3D a base de quitosana, gelatina e condroitina apresenta biocompatibilidade com as células-tronco isoladas do tecido adiposo, favorecendo a adesão, a viabilidade, proliferação e diferenciação dessas células. Ao serem implantadas *in vivo*, a matriz 3D não induz uma resposta inflamatória intensa e é capaz de permitir a diferenciação celular e angiogênese do implante possibilitando sua utilização *in vivo*. Assim, as matrizes 3D são carreadoras ideais de células-tronco permitindo o reparo ósseo *in vivo*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, M. d. M. eR. d. J. G. K., *Fisiologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008
- Alhadlaq, A. & Mao, J.J. Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. *Stem Cell and Development*. v. 13, p. 436–448, 2004.
- Ambrose C. G. & Clanton, T. O. *Ann. Biomed. Eng.*, 32,p.171, 2004
- Amit, M.; Carpenter, M.K.; Inokuma, M.S.; Chiu, C.P.; Harris, C.P.; Waknitz, W.A.; Itskovitz- Eldor, J.; Thomson, J.A. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potencial for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* v. 15, 227, p. 271-8, 2000.
- Anisimov SV, C. N., Correia AS, Li JY, Brundin P. NeuroStem Chip. A novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *BMC Genomics*. 8: 8-46, 2007.
- Appolonio, F.; Aragão, M.C.; Furlan, M.; Rapport, P.B.; Yoshimura, R.; Zanini, R.V.R. Síndrome de Van Der Hoeve e Kleyn: Relato de caso. *Acta cirúrgica brasileira*. v.18 (supl.4), 2003.
- Arosarena, O. A. e W. L. Collins. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg*. v.132, n.4, p.592-7. 2005.
- Arrigoni, E.; Lopa, S.; Girolamo, L. Stanco, D., Brini, A.T. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res*. v. 338, p.401–411, 2009.
- Ash, P J, Loutit, J. F.; Townsend, K. M. S. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature* 283, p.669-670, 1980.
- Athanasίου, K A, Niederauer G G, Agrawal C M Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17: 93-102, 1996
- Augello, A.; Kurth, T.B.; De Bari, C. Mesenchymal stem cells: A perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Materials* v. 20, p.121-133, 2010.
- Barbanti, S. H.; França, M.T.; Zavaglia, C.A.C & Duek, E.A.R. Polímeros reabsorvíveis na Engenharia de Tecidos- artigo de revisão. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, nº 1,13-21, 2005.
- Bacakova, L., E. Filova, *et al.* Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res*, v.53, p.35-45. 2004.
- Bagby, C. and Mannoni, P. Stem cell based- gene therapy. *The oncologist physician education*. v. 2, p. 196–202, 2004.
- Barbanti, S.H., Savaglia, C.A.C. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Ciência e tecnologia*. Vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005
- Baroni, P., Vieira, R.S., Meneghetti, E., Silva, M.G.C., Beppu, M.M. Evaluation of batch adsorption of chromium ions on natural and crosslinked chitosan membranes. *Journal of Hazardous Materials*. 2007

- Barry, F.P. & Murphy, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Review. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v.26, p. 568-84, 2004.
- Bauer, T.W.; Muschler, G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* v.371, p.10-27, 2000.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckie, A.M., Peault, B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci.*v. 89, p. 2804-08, 1992.
- Bhatia, S.K. Tissue engineering for clinical applications. *Biotechnology Journal*. v. 5, Issue 12, p.1309–1323, 2010.
- Beck, G. R. Jr.; Zerler, B.; Moran. Gene Array Analysis of Osteoblast Differentiation. *Cell Growth & Differentiation* v.12, p.61-83, 2001.
- Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* v. 221 (4486). P. 1052-1054, 1981
- Blair, H. C.; Kahn, A. J.; Crouch, E. C.; Jeffrey, J. J.; Teitelbaum, S. L. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J. Cell Biol.* 102 p.1164-1172, 1986.
- Bonfield W. Designing porous scaffold for tissue engineering. *Philosophical Trans R Soc A*, 364: 227-232, 2006.
- Bostwick, J. I. & Jones, G. Why choose autologous tissue in breast reconstruction. *Clin Plast Surg*. v.21, 2, p.165-175, 1994.
- Bracco, O.L., Miyamoto, F., Rafaelli, M.P., Denizar, V.A., Santilli, C., Castro, M.L. Hospital cost to treat acute femoral fracture due to osteoporosis at two medicine school hospitals of the Sistema Único de Saúde. *J Bras Econ Saúde* nº1p. 3-10, 2009
- Brasil. Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. *DATASUS*. Morbidade e informações epidemiológicas. Disponível em [http://:www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. *Saúde Brasil 2008 – uma análise da situação de saúde*. Brasília: MS; 2004. p.87-111.
- Breyner, N. M.; Hell, C. R.; Carvalho, L. R. P.; Machado, C. B.; Peixoto Filho, I. N.; Valério, P.; Pereira, M. M.; Goes, A. M. Effect of a Three-Dimensional Chitosan Porous Scaffold on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes *Cells Tissues Organs* v.190, p. 1-10, 2009.
- Bruder S. P., Jaiswal N, Haynesworth S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation *J Cell Biochem* 64: 278-294, 1997.
- Bruder S P, Kraus K H, Goldberg V M, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80: 985-996, 1998.
- Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon D H, Wong J B, King A and Tosteson A Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States *J. Bone Miner. Res.* 22 465-75 2007.

- Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., Quarto, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone *Matrix Biology*. v.22, p.81-91, 2003a.
- Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone Novartis Found Symp 249: 133, 2003b.
- Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. v.9, n.5, p.641-50, 1991.
- Caplan, A.I and Bruder, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21<sup>st</sup> century. *Trends in Molecular Medicine*. v.8, 7, 2001.
- Cserjesi, P.; Brown, D.; Ligon, K. L.; Lyons, G. E.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Olson, E. N. A basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*. 121 p.1099-1110, 1995.
- Chen, C. S.; Tan, J.; Tien, J. Mechanotransduction at cell matrix and cell-cell contacts. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. v.6, p. 275 – 302, 2004.
- Chen, C.W., Tsai, Y.H., Deng, W.P., Shih, S.N., Fang, C.L., Burch, J.G., Chen, W.H., Lai, W.F. Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*. n.23, p. 446-453, 2005.
- Chen J P and Cheng T H. Thermo-responsive chitosan-graft-poly (N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromol Biosci*. 8: 1026 – 1039, 2006 .
- Cheung, H.Y., K.T. Lau, *et al*. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites: Part B*, v. 38. p.291-300. 2007.
- Chick, W.L., Like, A.A., Lauris, V. Beta cells culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science*. v.187, p. 847-924, 1975.
- Christenson, R.H. Biochemical markers of Bone Metabolism: an review. *Clinical biochemistry*. v. 30, n.8, p. 573-593, 1997.
- Conrad, C.; Huss, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *Journal of Surgical Research*. v.124, p. 201 – 208, 2005.
- Cooper C, Campion G, Melton LJ Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporosis international* v. 2 p.285–289, 1992
- Cordonnier, T.; Langonné, A.; Sohier, J.; Layrolle, P.; Rosset, P.; Sensebe, L.; Deschaseaux, F. Consistent Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Bone Morphogenetic Protein 4 and Low Serum. *Tissue Eng Part C Methods*. Nov, 2010.
- Coutinho, D. F., *et al*. The effect of chitosan on the in vitro biological performance of chitosan-poly(butylene succinate) blends. *Biomacromolecules*, v.9, p.1139-1145. 2008.
- Cowan M.C.; Shi, Y.Y.; Aalami, O.O.; Chou, Y.F.; Mari, C.; Thomas, R.; Quarto, N.; Contag, C.H.; Wu, B.; Longaker, M.T. Adipose derived adult stromal cells heal size mouse calvarial defects. *Nat. Biotech*. v. 10, p. 1-8, 2004.
- Davies, J. E. 1996. In Vitro Modeling of the Bone/ Implant Interface. *The Anatomical Record*, v. 245, p. 426-445.
- Dawn, B. & Bolli, R. Adult bone marrow- derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol*. v.100, 6, p. 494-503, 2005.

- De Abreu, A.M. Autotransplantation of teeth. *Rev. Port. Estomatol. Cir. Maxilofac.* v.30, p. 47-54, 1989.
- Dennis JE, Esterly K, Awadallah A, Parrish CR, Poynter GM, Goltry KL. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem Cells.* 25(10):2575-82, 2007.
- De Gemmis P, L. C., Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, Pagano C, Pandolfo M, Fabbri A. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 15(5): 719-28, 2006.
- Desai, T.A. Micro-and nanoscale structures for tissue engineering constructs. *Med. Eng. Phys.* 22: 595-606, 2000.
- Di Martino, A., Sittinger, M., Risler, M.Y. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, v.26, p. 5983-90, 2005.
- Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. 2011. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Medicine*, v. 9, p. 66-76.
- Donati, I., Stredanska, S., Silvestrini, G., Vetere, A., Marcon, P., Marsich, E., Mozetic, P., Gamini, A., Paollet, S., Vittur, F. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. *Biomaterials*, v.26, p. 987-998, 2004.
- Ducy, P., Schincke, T., Karsenty, G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance *Science* v.289, p. 1501-04, 2000.
- Eastlund, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant.* v. 4, p. 455-77, 1995.
- Englert C; Blunk T; Müller, R; von Glasser SS; Baumer J; Fierlbeck J; Heid IM; Nerlich M and Hammer J. Bonding of articular cartilage using a combination of biomechanical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Research & Therapy* 9:1-11, 2007.
- Fano V, Rodríguez Celin M, Del Pino M, Buceta S, Obregón MG, Primomo C, García H, Miscione H, Lejarraga H Osteogenesis imperfecta. Clinical, functional and multidisciplinary evaluation of 65 patients *An Pediatr (Barc)* v.72, 5, p.324-330, 2010.
- Filip, S., English, D. Mokry, J. Issue in stem cell plasticity. *J. Cell. Mol. Med.* v. 8, n. 4, p. 572-77, 2004.
- Fischbach, G. D. e R. L. Fischbach. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest*, v.114, n.10, p.1364-70. 2004.
- Francis-Suh, J.K. & Matthew, H.W.T., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterial in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, v.21, p. 2589-2598, 2000.
- Friedenstein, A. J. Osteogenic stem cells in the bone marrow. *Bone and Mineral Research.* v. 7, ed. J.N.M., p. 243-272.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, *et al.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, v.3, n.4, Oct, p.393-403. 1970.

- Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S. 1970. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell and Tissue Kinetics*, v. 3, p. 393-403.
- Fujimura, J.; Ogawa, R.; Mizuno, H.; Fukunaga, Y.; Suzuki, H. Neural differentiation of adipose derived stem cell isolated from GFP transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications*. v. 333, p. 116-21, 2005.
- Fujita T.; Izumo, N.; Fukuyama, R.; Meguro, T.; Nakamuta, H.; Kohno, T.; Koida, M. Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells *Biochem Biophys Res Commun* v.280, p.348-352, 2001.
- Gajko-Galicka A “Mutations in type I collagen genes resulting in *osteogenesis imperfecta* in humans” *Acta Biochimica Polonica* 49: 433–441, 2002.
- Gawryszewski VP, Koizumi MS, Mello-Jorge MHP. As causas externas no Brasil no ano 2000: comparando a mortalidade e a morbidade. *Cad Saúde Pública*, Rio de Jeniro, p.995-1103, 2004.
- Ge, Z., Z. Jin, *et al.* Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. *Biomed Mater*, v.3, n.2, Jun, p.1-11. 2008.
- Gepstein, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res*, v.91, n.10, Nov 15, p.866-76. 2002.
- Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. 2005. Bone Substitutes: An Update. *Injury International Journal of The Care of The Injured*, v. 36S, p. s20-s27.
- Gokhale, P. J. e P. W. Andrews. Human embryonic stem cells: 10 years on. *Lab Invest*, v.89, n.3, Mar, p.259-62. 2009.
- Grenha, A., M. E. Gomes, *et al.* Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *J Biomed Mater Res A*, v.92, n.4, Mar 15, p.1265-72.
- Gun-II Im, Yong-Woon Shin, Kee-Byung Lee. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have - the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage*. p. 1–9, 2005.
- Hadjidakis, D. J.; Androulakis, I. I. 2006. Bone Remodeling. *Annals of The New York Academy of Sciences*, v. 1092, p. 385-396.
- Hansen M F, Nellissery M J and Bhatia P. Common mechanisms of osteosarcoma and Paget’s disease. *J Bone Miner Res* v.14(Suppl 2), p.39–44, 1999
- Hart, D. Overcoming complications of breast implants. *Plast. Surg. Nurs.* v. 23, p. 55-63, 2003.
- Harris, H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don’t know *Clinica Chimica Acta* 186: 133-150, 1989.
- Harrison,F.L., Beswick,T.M. e Chesterton, C.J. Separation of haemopoietic cells for biochemical investigation. Preparation of erythroid and myeloid cells from human and laboratory-animal bone marrow and the separation of erythroblasts according to their state of maturation. *Biochem J.* v.15; n.194(3): 789–796, 1981.
- Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*. 24(11): 2346-54, 2006.

- Hattori, H.; Sato, M.; Masuoka, K.; Ishiara, M.; Kikuchi, T.; Matsui, T.; Takase, B.; Ishizuka, T.; Kikuchi, M.; Fujikawa, K.; Ishihara, M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissue Organs*. v.178, p.2-12, 2004.
- Heaney R P Osteoporotic fracture space: An hypothesis *Bone Miner.* 6, p.1-13, 1989
- Haynesworth, S. E., J. Goshima, *et al.* Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, v.13, n.1, p.81-8. 1992.
- Hoffmann B, Seitz D, Mencke A, Kokott A, Ziegler G. Glutaraldehyde and oxidized dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffold for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 1495-503, 2009.
- Holmes, R. E. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects: a histometric study. *Journal Bone Joint Surger.* 68A, n.4: 904-911, 1986.
- Horowitz, J. R., A. Rivard, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.17, n.11, Nov, p.2793-800. 1997.
- Hotta, T. Dermal fillers. The next generation. Review. *Plast. Surg. Nurs.* v. 24, p. 14-9, 2004.
- Hou C H, Yang R S and Hou S M Hospital based allogenic bone bank – 10 years experience *J. Hosp. Infect.* 59 41-5, 2005.
- Huang, J.I.; Beanes, S.R.; Zhu, M., Lorenz, P.; Hedrick, M.H.; Benhaim, P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plastic and Reconstructive surgery.* v. 109. n.3, p. 1033-1041.2002.
- Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally S V “In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering.” *Biomaterials* 26: 7616 – 7627, 2005.
- Hui, J.H.P.; Onyang, H.W.; Hutmacher, D.W.; Goh, J.C.H.; Lee, E.H. Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering: E review of recent advances in natural university of singapore. *Annals Academy of Medicine.* v. 34, p. 206-212, 2005.
- Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, n.24, Dec, p.2529-43. 2000.
- Huvos, A. G. Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons A clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years. *Cancer* v.57, p.1442–1449, 1986.
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J.R.Soc Interface.* 3, p.589-601, 2006.
- Im, G., Shin, Y.e Lee, K. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *OsteoArthritis and Cartilage* v.13, p. 845-853, 2005.
- Johnell O, Kanis J A, Oden A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Petterson C, De Laet C and Jonsson B Mortality after osteoporotic fractures *Osteoporosis International* 15 38-42, 2004.
- Kanis, J. A. 2002. Diagnosis of Osteoporosis and Assessment of Fracture Risk. *The Lancet*, v. 359, p. 1929-1936.

- Kanis, J. A.; Borgstrom, F.; De Laet, C.; Johansson, H.; Johnell, O.; Jonsson, B.; Oden, A.; Zethraeus, N.; Pflieger, B.; Khaltayev, N. 2005. Assessment of Fracture Risk. *Osteoporosis International*, v. 16, p. 581-589.
- Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials*, v. 26, p. 5474-5491. 2005.
- Kassem, M.; Kristiansen, M.; Abdalla, B. M. Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. v. 95, p. 209 – 214, 2004.
- Kraus, KH & Kirker-Head, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Veterinary Surgery* 35:232–242, 2006.
- Kawai, M.; Mödder, U.I.; Khosla, S., Rosen, C.J. Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration. *Nat Rev Drug Discov*. v.10,2, p.141-156, 2011.
- Khor, E. e L. Y. Lim. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v.24, n.13, p.2339-49. 2003.
- Kim, S.E., Park, H.J., Cho, Y.W., Chung, H., Jeong, S.Y., Lee, E.B., Kwon, I.C. Porous chitosan scaffold contain microspheres loadedwith transforming growth factor  $\beta$ 1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of controlled Release*, v. 91, p.365-374, 2003.
- Kirschstein, R. & Skirboll, L. Stem Cell: Scientific Progress and future research directions. *National Institutes of Health*, 2001.
- Kucia, M., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous – That is the question. *Experimental hematology* v. 33, p. 613–623, 2005.
- Kulkarni, R. K.; Pani, K. C.; Leuman, C.; Leonard, F. *Arch. Surg.* 93, p.839, 1966.
- Kulterer B, F. G., Jandrositz A, Sanchez-cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 12: 8-70, 2007.
- Laschke, M.W; Strohe, A. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta biomaterialia*. v.5, p.1991-2001, 2009.
- Lakshmiopathy, U. & Verfaillie. Stem cell plasticity. *Blood reviews* v. 19, p. 29–38, 2005.
- Langer, R. & Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science*. v. 14, 260, p. 920-926, 1993.
- Langer, R. & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428, p.487-492, 2004.
- Langer, R. & Vacanti, J.P Tissue engineering: the challenges ahead *Sci Am* 280: 86–92, 1999.
- Lawrence, B. J. e S. V. Madihally. Cell colonization in degradable 3D porous matrices. *Cell Adh Migr*, v.2, n.1, Jan, p.9-16. 2008.
- Le Trong, I., McDevitt, T. C., Nelson, K. E., Stayton, P. S., Structural characterizationand comparison of RGD cell-adhesion recognition sites engineered into streptavidin. *Acta Crystallogr*, v.59, p.828-34, 2003.



- Lee, S.J., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J-S., Yoo, Y.J. Identification of proteins differentially expressed during chondrogenesis of mesenchymal cells. *FEBS Letters* v.536, p.35-40, 2004.
- Lee, J., Kim, K, Kwon, I., Ahn, H., Lee, S., Cho, H., Kim, H., Seong, S., Lee, M. Effects of the controlled-released TGF- $\beta$ 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials* v.25, p. 4163–4173, 2005.
- Li Junjie; Sun, H.; Zhang, R.; Li, R.; Yin, Y. Wang, Y.; Liu, Y.; Yao, F.; Yao, K. Modulation of mesenchymal stem cells behaviors by chitosan/gelatin/pectin network films. *Journal of biomedical materials research B: Applied biomaterials*. 95B, 2, 2010.
- Li, L. & Xie, T. Stem cell niche: Structure and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Bio.* v. 21, p. 605 – 31, 2005.
- Lichte, P.; Pape, H. C.; Pufe, T.; Kobbe, P.; Fischer, H. Scaffolds for Bone Healing: Concepts, Materials and Evidence. *Injury International Journal of The Care of The Injured*, 42, p. 569-573, 2011.
- Liu, T. V. & Bhatia S. N. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 56, p.1635, 2004.
- Liu X, Ma P X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering* 32, p.477 – 486, 2004.
- Liu, T. M.; Martina, M.; Hutmacher, D. W.; Hui, J. H. P.; Lee, E. H.; Lim, B. 2007. Identification of Common Pathways Marrow- and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells into Three Mesenchymal Lineages. *Stem Cells*, v. 25, p. 750-760.
- Lo, K. C., W. W. Chuang, *et al.* Stem cell research: the facts, the myths and the promises. *J Urol*, 170, 6 Pt 1, Dec, p. 2453-8. 2003.
- Locke, M.; Feisst, V.; Dunbar, R. Concise Review: Human Adipose-derived Stem Cells (ASC): Separating Promise from Clinical Need. *Stem Cells*. v. 29, 3, p. 404-11, 2011.
- Long, M.W. Osteogenesis and Bone-Marrow derived cells. *Blood Cells, Molecules and disease*. v. 27, 3, p. 677-690, 2001.
- Lutolf, M. P. e J. A. Hubbell. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, v.23, n.1, Jan, p.47-55. 2005.
- Lysaght, M. J. & Hazlehurst, A. L. Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Eng*.10, p.309-320, 2004.
- Ma, D., Ren, L., Liu, Y., Chen, F., Zhang, J., Xue, Z., Mao, T. Engineering Scaffold-Free Bone Tissue Using Bone Marrow Stromal Cell Sheets. *Journal os orthopaedic Research*. v.28,5, p.697-702, 2009.
- Machado, C.B.; Ventura, J.M.; Lemos, A.F.; Ferreira, J.M.F.; Leite, M.F.; Goes, A.M. 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomedical materials* . 2, p. 1-8, 2007.
- Mackie, E. J. 2003. Osteoblasts: Novel Roles in Orchestration of Skeletal Architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, p. 1301-1305.

- Madonna, R.; Geng, Y.; De Caterina, R. Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Characterization and Potential for cardiovascular repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* v.29, p.1723-1729, 2009.
- Mankin H J, Hornicek F J and Raskin K A Infection in massive bone allografts *Clin. Orthop. Relat. Res.* 432 210-16 2005.
- Mano, J. F., Oliveira, J. T., *et al.* Bone, cartilage and osteochondral tissue engineering strategies using natural origin polymers and ceramics, growth factors and progenitor cells. *Tissue engineering:Part A*, v.14, n.8, p.707, 2008.
- Marijanovic, I. , Radnic, M., Matic, I., Erceg-Ivkosic, I. Osteogenesis imperfecta and achievements in cell and gene therapy. *Acta Med Croatica* v.64,3,p.191-200, 2010.
- Mass, C.S., Papel, I.D., Greene, D., Stoker, D.A. Complications of injectable synthetic polymers in facial augmentation. *Dermatol. Surg.* v.23, p. 871-7, 1997.
- Melton 3<sup>rd</sup>,L. J. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population *Journ. of Bone and Mineral Res.* 8, p.1139-1141, 2003.
- Meltzer. J.C., Grimm, P.C., Greenberg, A.H. and Nance, D.M. Enhance immunohistochemical detection autonomic nerve fibers cytokines and inducible nitric oxide synthase by light and fluorescent microscopy in rat spleen. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, v.45, p.599-610, 1997.
- Miranda, S. C. C. C.; Silva, G. A. B.; Hell, R. C. R.; Martins, M. D.; Alves, J. B.; Goes, A. M. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction *Archives of oral biology* 56, p.1-15, 2011.
- Misra, S. K., S. P. Valappil, *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, v.7, n.8, Aug, p.2249-58. 2006.
- Mizuno, H. & Hyakusoko, H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human process lipoaspirate cells *J. Nippon. Med. Sch.* v.70, 4, p. 300-6, 2003.
- Mok PL, L. C., Cheong SK. Isolation and identification of putative mesenchymal stem cells from bone marrow. *Malays J Pathol.* 25(2): 121-7, 2003.
- Mosmann, T. rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods.* 16, n. 65, p. 55-63.
- Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine* 18: 1-12. 2008.
- Morrison, S.J., Uchida, N., Weissman, I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, p. 35-71, 1995.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J.Immunol. Methods.* v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.
- Mountford, J. C. 2008. Human Embryonic Stem Cells: Origins, Characteristics and Potential for Regenerative Therapy. *Transfusion Medicine*, v. 18, p. 1-12.
- Murphy, J.J.; Dixon, K.; Beck, S.; Fabian, D.; Feldman, A.; Barry, F.P. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis, *Arthritis Rheumatism.* 46, p. 704-13, 2002.

- Muschler GF, N. H., Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K, Easley K. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res.* 407: 102-18. 2003.
- Nahabedian, M.Y.; Momen, B.; Manson, P.N. Factors associated with anastomotic failure after microvascular reconstruction of the breast . *Plast. Reconstr. Surg.* 114, p. 74-82, 2004.
- Nam, Y. S.; Park, T. G.. Porous Biodegradable Polymeric Scaffolds Prepared by Thermally Induced Phase Separation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 47, p. 8-17, 1999.
- Nardi NB & da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *HEP* (2006) 174: 249-82.
- Nomura. S; Takano T. Molecular Events Caused By Mechanical Stress In Bone. *Matrix Biol*; 19: 91-96, 2000.
- Ng, A.M., Saim, A.B., Tan, K.K., Tan, G.H., Mokhtar, S.A., Rose, I.M., Othman, F., Idrus, R.B. Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. *J Orthop Sci.*; 10, n.2, p.192-9, 2005.
- Nussbaum, J., E. Minami, *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *Faseb J*, 21, n.7, p.1345-57. 2007.
- Nyman, J. S., Reyes, M.; Wang, X. Effect of ultra structural changes on the toughness of bone *Micron.* 36 p.566-582, 2005.
- Ogawa, R., Mizuno, H., Atsushi, W., Migita, M., Shimada, T., Hyakusoku, H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvest from GFP transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v.313, p. 871-877, 2004.
- Orchard, K. and Cooper, M. Targeting the bone marrow: applications and stem cell transplantation. *Q J.Nucl. Med. Mol. Imaging.* v. 48, p. 267–78, 2005.
- Oréface, Rodrigo Lambert. Biomateriais; fundamentos e aplicações/ Rodrigo Lambert Oréface, Marivalda de Magalhães Pereira, Herman Sander Mansur. – Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- Parfitt., A.M. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact* v. 2, 6 p.499-500, 2002.
- Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical. *cord blood. J Vet Sci.*;7(4):343-8. 2006
- Pinheiro, A. L. B., Limeira Junior, F.A., Gerbi, M.E.M. Effect of 830 nm laser light on the repairs of bone defects grafted with inorganic bovine bone and calcified cortical osseous membrane. *J. Clin. Laser Med.* 21: 383-388, 2003.
- Placzek, M.R.; Chung, I.M.; Macedo, H.M.; Ismail, S.; Blanco, T.M.; Lim, M.; Cha, J.M.; Fauzi, I.; Kang, Y.; Yeo, D.C.L.; Ma, C.Y.J, Polak, J.M. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J. R. Soc. Interface* v.6, p. 209-232, 2009.
- Planat-Bernard, V.; Silvestre, J.S.; Cousin, B *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* v. 109, p. 656-63, 2004.

- Pirracco, R.; Obokata H, Iwata T, Marques A, Tsuneda S, Yamato M, Reis RL, Okano T. Development of Osteogenic Cell Sheets for Bone Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part A*. Jan, 2011
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswail, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Morrman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. v. 284, p. 143-47, 1999.
- Peggy, M.C. Differences in Osteoporosis and Fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2011.
- Porter, J.R.; Timothy, T.R.; Popat, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies *Biotechnol. Prog.* 25 1549-60, 2009.
- Prasad, R., Lambe, S., Kaler, P., Pathania, S., Kumar, S., Attri, S., Singh, S.K. Ectopic expression of alkaline phosphatase in proximal tubular brush border membrane of human renal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica acta*. 2005.
- Raisz, L. G. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*, v. 45, p. 1353-1358, 1999.
- Raisz, L. G. Physiology of bone (Chapter 61), em Becker KL, Bilezikian JP, Bremner WJ, et al (Eds): Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism Philadelphia: JB Lippincott Company, pp 468-475, 1990.
- Riera-Espinoza, G.; Ramos, J.; Carvajal, R.; Belzares, E.; Stanbury, G.; Farias R.; Valderrama, I.; Alvarez, K.; Riera-Gonzalez, G. Changes in bone turnover during tibolone treatment. *Maturitas* v.47 p.83-90, 2004.
- Ringe, J., C. Kaps, *et al*. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*, v.89, n.8, Aug, p.338-51. 2002.
- Ripamonti, U.; Tsiridis, E.; Ferretti, C.; Kerawala, C.J.; Mantalaris, A.; Heliotis, M. Perspectives in regenerative medicine and tissue engineering of bone. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* v.6, 2010.
- Risbud, M., J. Ringe, *et al*. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant*, v.10, n.8, p.755-63. 2001.
- Robey, P.G. Stem cells near the century mark. *J. Clin. Invest.* p. 1489-1491, 2005.
- Rocha, L. B., G. Goisis, *et al*. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, v.23, n.2, Jan, p.449-56. 2002.
- Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* v. 239, p. 375-80, 1964.
- Rodriguez AM; Elabd C; Amri EZ; Ailhaud G; Dani C. The human adipose tissue is a source of a multipotent stem cells. *Biochimie* 87:125-128, 2005.
- Roodman, G. D. & Windle, J. J. Paget disease of bone. *The Journal of Clinical Investigation* v.115, p.200-208, 2005.
- Rosa, A. L.; Beloti, M. M.; Noort, R. V. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. *Dental Materials*. v.19, p. 768-72, 2003.

- Rosa, A.L., Oliveira, P.T., Beloti, M.M. Review: Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices*. V. 5, 6, p. 719-728, 2008.
- Rose, F. R. e R. O. Oreffo. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*, v.292, n.1, Mar 22, p.1-7. 2002.
- Rosenthal, N. Prometheus's vulture and stem cell promise. *N. Engl. J. Med.* v.17, 349, p. 267-74, 2003.
- Rustad, K., Levi, M.S.B., Longaker, M.T., Gutner, G.C. Strategies for organ level tissue engineering. *Organogenesis* 6:3, p. 151-157, 2010.
- Salgado, A. J., O. P. Coutinho, *et al.* Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*, v.4, n.8, Aug 9, p.743-65. 2004.
- Schoenfeld, A.J., Hornicek, F.J., Pedlow, F.X. Osteosarcoma of the spine: experience in 26 patients treated at the Massachusetts General Hospital. *The Spine Journal*. v.10, p. 708-714, 2010.
- Seal, B.L., T.C. Otero, *et al.* Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering*, v.34, p.147-230. 2001.
- Seong, J. M.; Kim, B.; Park, J.; Kwon, I. K.; Mantalaris, A.; Hwang, Y. Stem Cells in Bone Tissue Engineering. *Biomedical Materials*, v. 5, p. 1-15, 2010.
- Sikavitsas, V. I.; Temeno, J. S.; Mikos, A. G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. *Biomaterials*, v. 22, p. 2581-2593, 2001.
- Singer, N.G. & Caplan, A.I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* v.6 p. 457-478, 2011.
- Shin, H.; Jo, S.; Mikos, A. G. *Biomaterials* 24, p.4353, 2003.
- Sommerfeldt, D. W.; Rubin, C. T. Biology of Bone and How It Orchestrates the Form and Function of the Skeleton. *European Spine Journal*, v. 10, p. S86-S95, 2001.
- Stegman, S.J.; Chu, S.; Armstrong, R.C. Adverse reactions to bovine collagen implants: clinical and histologic features. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* v.14, p.39-48, 1998.
- Strem, M.B., Hicok, K.C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R.E., Fraser, J.K., Hedrick, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* v. 54, n. 3, p.132-142, 2005.
- Sugiura, F.; Kitoh, H.; Ishiguro, N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cell after several passages. *Biochemical and biophysical research communications*. v. 316, p. 233-39, 2004.
- Suh, J. K. e H. W. Matthew. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, v.21, n.24, Dec, p.2589-98. 2000.
- Tabata, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications, *J. R. Soc. Interface* v.6 Suppl 3, Jun 6, p.S311-24. 2009.
- Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface* 6: S311-S324, 2006.
- Takahashi K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 126: 663-76. 2006.

- Tanaka, H., Murphy, C.L, Murphy, C., Kimura, M., Kawai, S., Polak, J.M. Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem.* v.93, n.3, p.454-62, 2004.
- Tedeschi E, Antoniazzi F, Venturi G, Zamboni G, Tato L “Osteogenesis imperfecta and its molecular diagnosis by determination of mutations of type I collagen genes” *Pediatr Endocrinol Rev* 4: 40-6, 2006.
- Thein-Han, W. W. e R. D. Misra. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, v.5, n.4, p.1182-97. 2009.
- Thomson JA; Eldor JI; Shapiro SS; Waknitz MA; Swiergiel JJ; Marshall VS; Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282: 1145-1147, 1998.
- Tondravi M M, McKercher S R, Anderson K, Erdmann J M, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL “Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU1” *Nature* 386: 81-84, 1997.
- Tortelli F & Cancedda R. Three dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage *in vitro.* *Eur Cells and Materials* 17:1-14, 2009.
- Turner, C.H, Robling, A.G. Duncan, R.L. Do Bone Cells Behave Like A Neuronal Network? *Calcify Tissue Int:* 70: 435-442, 2002.
- Ucelli A; Moretta L and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature* 8:726-37, 2008.
- Vacanti J P, Langer R Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354: SI 32–4, 1999.
- Vacanti, J.P.; Vacanti, C.A., The history and scope of tissue engineering *J. Principles of tissue engineering.* ed. 2. San Diego: Academic Press, 2000.
- Valerio, P., Pereira, M., Góes, A., Leite, M. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* v.25, p.2941-2948, 2004.
- Venturi, G.; Tedeschi, E.; Mottes, M.; Valli, M.; Camilot, M.; Viglio, S.; Antoniazzi, F.; Tato, L. 2006. Osteogenesis Imperfecta: Clinical, Biochemical and Molecular Findings. *Clinical Genetics*, v. 70, p. 131-139
- Volarevic, V.; Arsenijevic, N.; Stojkovic, M. Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus *Stem Cell.* v.29,1, p: 5-10, 2011.
- Xia, W., W. Liu, *et al.* Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v.71, n.2, p.373-80. 2004.
- Wagner, W., F. Wein, *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, v.33, n.11, Nov, p.1402-16. 2005.
- Wagers, A. J.; Weissman, I. L. 2004. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*, v. 116, p. 639-648.

- Wang, Y., Kim, U-J., Blasioli, D. J., Kim, H-J. and Kaplan, D.L. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffold and mesenchymal stem cell. *Biomaterials*, 2005.
- Wang XH, Li DP, Wang WJ, et al. Cross-linked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, v.24, p.3213-3220. 2003.
- Weissman, I.L. Stem cells: unit of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. v. 100, p. 157-68, 2000.
- Williams, D.F. To engineering is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends in Biotechnol.* 24,1, p. 4-8, 2006.
- Wilson, C. H.; Myers, E. R.; Morris, J. N.; Gerhart, T. N.; Yett, H. S.; Lipsitz, L. A. Impact near the hip dominates fracture risk in elderly nursing home residents who fall. *Calcified Tissue International* v. 52 p.192-198,1993.
- Wilson, A.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M. Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell Prolif.* v.44, p.86-98, 2011.
- Wyat, J.P. Reporting breast implant complications. *Plast. Surg. Nurs.* v. 23, p. 49-54, 2003.
- Yamane, S., Iwasaki, N., Majina, T., Funakoshi, T., Masuko, T., Harada, K., Minami, A., Monde, K., Nishimura, S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v.26, p. 611-619, 2005.
- Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J biomed Mater Res.* V. 14 p. 107-132, 1980.
- Yarak, S.; Okamoto, O.K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol.* v.85, 5, p.647-56, 2010.
- Young, H.E. & Lucas, P.A. Pluripotent mesenchymal stem cells and methods of use thereof. *US Patent.* n° 5,827,735, 1998.
- Young, H.E.; Mancini, M.L.; Black, A.C. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn.* v.202, p.137-144, 1995.
- Zabaglia, S. I., Costa-Paiva, F. C., Simões, L. H., Pinto-Neto, A. M. Is Tubal Ligation a Risk Factor for a Reduction of Bone Mineral Density in Postmenopausal Women? *Rev Bras Ginecol Obstet* v.23, p. 621-626, 2001.
- Zonari, A.A.C.; Novikoff, S.; Electo, N.R.P.; Breyner, N.M.; Gomes, D.A.; Martins, A.; Neves, N.M.; Reis, R.L., Goes, A.M. Endothelial Differentiation of Human Stem Cells Seeded onto Electrospun Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxybutyrate-Co-hydroxyvalerate Fiber Mesh. *Plos one*, v.7 (4) p.1-9.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J.I., Futrell, W.J., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue.Eng.* v.7, p. 211-226, 2001.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J., Benhaim, P., Hedrick, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. *Molecular biology of the Cell.* v. 13, p. 4279-4295, 2002.